

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ÜBERTRAGUNG
MATERNALER IMMUNGLOBULINE UND ZUR ONTOGENESE
DER IMMUNGLOBULINSYNTHESE BEIM HAUSHUHN**

BERND KASPERS

Disbui. München

1989



Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. U. Lösch

UNTERSUCHUNGEN ZUR ÜBERTRAGUNG MATERNALER IMMUNGLOBULINE UND ZUR
ONTOGENESE DER IMMUNGLOBULINSYNTHESE BEIM HAUSHUHN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Bernd Kaspers
aus
Leverkusen

München 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Kösters

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Table of Contents

Seite

1.	Einleitung	1
1.1.	Allgemeine Einführung	1
1.2.	Die Bedeutung der Eltern im Kindesalter	2
1.3.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	3
1.3.1.	Kindheit und Jugend	3
1.3.2.	Kindheit und Jugend	4
1.4.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	5
1.5.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	6
1.6.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	7

2.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	12
2.1.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	12
2.2.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	13
2.3.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	14
2.4.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	15
2.5.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	16
2.6.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	17
2.7.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	18
2.7.1.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	19
2.7.2.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	20
2.7.3.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	21
2.8.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	22
2.9.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	23
3.	Die Rolle der Eltern im Kindesalter	24

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG UND LITERATUR	1
1.1. <u>Allgemeine Einführung</u>	1
1.2. <u>Die Entwicklung des Dotter- und Eiklarsackes</u>	2
1.3. <u>Maternale Immunglobuline im unbebrüteten und bebrüteten Ei</u>	3
1.3.1. <u>Immunglobulin G</u>	3
1.3.2. <u>Immunglobulin M und A</u>	4
1.4. <u>Literatur zur Immunglobulinsynthese und -sekretion durch den Hühnerembryo und das Küken</u>	7
1.5. <u>Literatur zur Bursektomie des Haushuhns</u>	9
1.6. <u>Fragestellung der Arbeit</u>	10
2. MATERIAL UND METHODEN	12
2.1. <u>Tiermaterial und Tierhaltung</u>	12
2.2. <u>Chemische Bursektomie</u>	12
2.3. <u>Aufzucht und Haltung der bursektomierten Tiere</u>	13
2.4. <u>Injektion der antikörperhaltigen Lösungen</u>	14
2.5. <u>Probengewinnung und Probenaufarbeitung</u>	15
2.5.1. <u>Serumproben</u>	15
2.5.2. <u>Dotterproben</u>	15
2.5.3. <u>Eiklarproben</u>	15
2.5.4. <u>Dottersackproben</u>	16
2.5.5. <u>Amnion- und Allantoisflüssigkeit des 16 Tage alten Embryos</u>	17
2.6. <u>Herstellung der Antiseren</u>	17
2.7. <u>Reinigung der Immunglobuline</u>	18
2.7.1. <u>Gewinnung von Standard-Reinsubstanzen</u>	18
2.7.1.1. <u>Immunglobulin A</u>	18
2.7.1.2. <u>Immunglobulin M</u>	18
2.7.1.3. <u>Immunglobulin G</u>	19
2.7.2. <u>Gewinnung von Eiklarimmunglobulinen</u>	19
2.7.3. <u>Gewinnung von Dottersackimmunglobulinen</u>	20
2.8. <u>Nachweisverfahren</u>	20

2.8.1.	Proteinbestimmung	20
2.8.2.	Doppelte Immundiffusion (nach Ouchterlony)	21
2.8.3.	Rocket-Immunelektrophorese (nach Laurell)	21
2.8.4.	Immunelektrophorese (nach Graber und Williams)	22
2.8.5.	Färbetechniken für Agarosegele	22
2.8.6.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (nach Laemmli)	23
2.8.7.	Immunoblotting	25
2.9.	<u>Statistische Methoden und Berechnungen</u>	26
2.10.	<u>Puffer und Lösungen</u>	27
3.	ERGEBNISSE	32
3.1	<u>Erstellen eines Standardserums</u>	32
3.2.	<u>Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit der Rocket-Immunelektrophorese</u>	33
3.3.	<u>Bestimmung der IgA-Konzentrationen im Dotter frisch gelegter Eier</u>	34
3.4.	<u>Vergleich der Immunglobulinmengen des Eiklars frisch gelegter Eier mit denen des Dottersackinhaltes 21 Tage alter Embryonen</u>	34
3.5.	<u>Molekulargewichtvergleich der Immunglobuline IgM und IgA im Eiklar und Dottersackinhalt</u>	39
3.6.	<u>Ergebnis der chemischen Bursektomie</u>	42
3.6.1.	Aufzucht der Tiere	42
3.6.2.	Immunglobulinnachweis im Serum der bursektomierten Hennen	46
3.6.3.	Ergebnisse der Untersuchungen an Eiern, Embryonen und Nachkommen der agammaglobulinämischen Hennen	47
3.6.3.1.	Untersuchung frisch gelegter Eier	47
3.6.3.2.	Untersuchung der extraembryonalen Kompartimente des 16 Tage bebrüteten Eies	47
3.6.3.3.	Untersuchung des Dottersackinhaltes 21 Tage alter Embryonen	48
3.6.3.4.	Untersuchung der Immunglobulinkonzentrationen im Serum der Nachkommen agammaglobulinämischer und immunologisch intakter Hennen	48
3.7.	<u>Ergebnisse der intravenösen Injektion der Immunglobuline IgM und IgA in agammaglobulinämische Hennen</u>	53

4.	DISKUSSION	58
4.1.	<u>Besprechung der Meßmethode</u>	58
4.2.	<u>Diskussion der Ergebnisse</u>	59
4.2.1.	Quantitative Bestimmung des Immunglobulins IgA im Dotter frisch gelegter Eier	60
4.2.2.	Vergleich der Immunglobulinkonzentrationen und -mengen im Eiklar des unbebrüteten Eies mit denen des Dottersackinhaltes am 21. Tag der Brut	61
4.2.3.	Vergleich der Molekulargewichte der Eiklar- und Dottersackimmunglobuline IgM und IgA	63
4.2.4.	Am Modell agammaglobulinämischer Hennen gewonnene Ergebnisse	65
4.2.4.1.	Aufzucht, Haltung und Immunstatus bursektomierter Hennen	66
4.2.4.2.	Untersuchungen an Embryonen agammaglobulinämischer Hennen	67
4.2.4.3.	Untersuchung der Serumimmunglobulinkonzentrationen der Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen während des ersten Lebensmonates	68
4.2.5.	Intravenöse Injektion der Immunglobuline IgM und IgA in agammaglobulinämische Legehennen. Untersu- chung der Übertragung auf das Ei	71
4.3.	<u>Abschließende Besprechung der Ergebnisse</u>	74
5.	ZUSAMMENFASSUNG	77
6.	SUMMARY	79
7.	TABELLARISCHER ANHANG	81
8.	LITERATURVERZEICHNIS	100

Abkürzungen

cIgG ⁺	cytoplasmatisches IgG, IgM oder IgA wurde in derart
cIgM ⁺	gekennzeichneten Zellen nachgewiesen
cIgA ⁺	
sIgG ⁺	IgG, IgM oder IgA wurde auf der Oberfläche (Zellmembran)
sIgM ⁺	derart gekennzeichneten Zellen nachgewiesen
sIgA ⁺	
TP	Testosteronpropionat
CP	Cyclophosphamid
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Rocket-IE	Rocket-Immunoelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline

1. EINLEITUNG UND LITERATUR

1.1. Allgemeine Einführung

Für die immunologische Forschung gewann das Haushuhn erst seine herausragende Bedeutung, als Glick, Chang und Jaap (1956) die Funktion der Bursa Fabricii erkannten.

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben seither die Funktion dieses Organs untersucht. Die Ergebnisse der Arbeiten zeigten, daß die Bursa Fabricii beim Haushuhn das zentrale Organ der B-Zell-Reifung darstellt und führten schließlich mit zur Entwicklung des heutigen Konzeptes von einer Zweiteilung des Immunsystems in das B-Zell- und das T-Zell-System. Diese Vorstellung, obwohl zunächst am aviären Immunsystem erarbeitet, hat auch für die Säugetiere allgemeine Gültigkeit (Glick, 1987).

Das Haushuhn stellt, auf Grund seiner anatomisch abgrenzbaren Bursa, nach wie vor ein einzigartiges Modell zur Untersuchung der Ontogenese des Immunsystems, des B-Zell-Systems und der spezifischen, humoralen Immunität dar (Templis, 1988).

Hierzu existiert eine umfangreiche Literatur. Die zur Zeit wohl vollständigste Zusammenfassung der Erkenntnisse findet sich bei Toivanen und Toivanen (1987).

Besondere Aufmerksamkeit fand dabei die Frage nach dem Beginn der Antikörpersekretion bei den Immunologen, aber darüber hinaus auch bei den Virologen, da deren Beantwortung für die Durchführung von Vakzinationen von Interesse ist.

Bereits 1971 beschrieben Löscher und Schumacher auf der Tagung der Gesellschaft für Immunologie das Immunglobulin M im Dottersack des frisch geschlüpften Küchens. Da weder im Eifollikel der Legehenne, noch im Dotter des Hühnereies, noch im Serum des Eintagküchens dieses Immunglobulin zu finden war, vermuteten die Autoren eine IgM-Synthese im embryonalen oder extraembryonalen Gewebe.

Unbekannt war zu diesem Zeitpunkt noch die Existenz maternaler Antikörper im Eiklar des Hühnereies. Auch die während der Embryogenese auftretenden Verschiebungen dieser Immunglobuline innerhalb der sich entwickelnden intra- und extraembryonalen Kompartimente wurde erst in den Folgejahren genauer untersucht.



1.2. Die Entwicklung des Dotter- und Eiklarsackes

Zum besseren Verständnis dieser Vorgänge soll zunächst die Entwicklung des Dotter- und Eiklarsackes beschrieben werden. Die Zusammenfassung wurde nach den Arbeiten von Hamilton (1952) und Romanoff (1960) angefertigt.

Zum Zeitpunkt der Ovulation ist der Dotter von der Membrana vitellina umgeben. Die Bildung des eigentlichen Dottersackes geht vom Embryo aus. Mesenchymale Membranen umwachsen die Dotterkugel, werden vaskularisiert und umgeben am 4. Tag der Brut den gesamten Dotter, mit Ausnahme eines kleinen Bereiches, der dem Embryo gegenüber liegt. Dieser wird als Umbilicus bezeichnet. Hier liegen Eiklar und Dotter noch nebeneinander, wie zum Zeitpunkt der Eiablage nur durch die Membrana vitellina getrennt.

Zwischen dem 3. und 5. Tag der Embryonalentwicklung treten große Mengen an Wasser aus dem Eiklar in den Dotter über. Wie dieser Vorgang abläuft ist noch ungeklärt. Er führt zur Vergrößerung des Dottersackvolumens und so zum Riß der Membrana vitellina im Bereich des Embryos. Sie gleitet am Dotter entlang auf den Umbilicus zu, bleibt aber zwischen Dotter und Eiklar noch bestehen. Zwischen dem 8. und 10. Tag wird das Ektoderm, das den Umbilicus umgibt, in das Eiklar ausgestülpt und wächst ein Stück in dieses hinein. Dabei gelangt wenig Dottersackinhalt in das Eiklar, soll sich mit diesem aber nicht mischen und wird gegen Ende der Entwicklung wieder in den Dottersack zurückverlagert.

Zwischen dem 16. und 17. Tag wird der Umbilicus durch zentripetales Wachstum des Dottersackmesoderms endgültig, im Sinne einer Narbe, geschlossen. Durch die Wasserabgabe an den Dottersackinhalt wird das Eiklar zunehmend visköser und spezifisch schwerer. Dadurch verändert es seine Lage im Ei und kommt unter dem sich bildenden Dottersack am Schwanzende des Embryos zu liegen. Hier hat es engen Kontakt mit dem Amnion, welches bis zum 4. Tag gebildet wird.

Die zu diesem Zeitpunkt schon gebildete Allantois expandiert sehr schnell, kommt in engen Kontakt mit dem Chorion und umwächst, zusammen mit diesem, das Eiklar, was zur Bildung des Eiklarsackes führt. Dieser Vorgang beginnt um den 9. Tag und ist am 13. Tag mit dem Schluß des Eiklarsackes beendet.

Nur an zwei Stellen ist das Eiklar nicht vollständig umschlossen. Zum einen ist das der Bereich des Dottersackumbilicus, wie oben beschrieben. Zum anderen bleibt der Kontakt zwischen Amnion und Eiklar auf Grund der besonderen Eihautverhältnisse an der Stelle weiter bestehen.

Diese, als sero-amniotische Verbindung bezeichnete Struktur, stellt einen breiten Fusionsbereich zwischen Amnion und Chorion dar, und entsteht bereits beim Schluß des Amnions.

Die sero-amniotische Verbindung perforiert am 11. Tag der Inkubation, was zum Übertritt von Eiklar in die Amnionflüssigkeit führt. Bis zum Schlupf ist das verbliebene Eiklar in das Amnion gelangt. Der Embryo beginnt am 10.-12. Tag (Vrbitch, 1924) Amnionflüssigkeit abzuschlucken und nimmt so oral Eiklar auf. Hanan (1927) konnte diese Vorgänge durch Injektion von Tryphonblau in das Eiklar darstellen. Er zeigte in diesem Versuch auch den Übertritt von Eiklar in den Dottersackinhalt. Ein kleiner, verbleibender Rest des Eiklars wird, im Bereich des Umbilicus am Dottersack hängend, mit diesem in die Körperhöhle verlegt.

Beim frisch geschlüpften Küken findet sich etwa ein Drittel des Dottervolumens als Dottersackinhalt in der Bauchhöhle (Romanoff, 1960). Dieser wird in den folgenden Tagen, nach der Muskularisierung der Dottersackhaut, durch den Dottersackstiel in den Darm gepreßt und resorbiert (Jordanov und Anastassova-Kristeva, 1963).

1.3. Maternale Immunglobuline im unbebrüteten und bebrüteten Ei

Während beim Säugetier maternale Antikörper entweder über die Plazenta und die Kolostralmilch oder nur durch letztere auf den Embryo bzw. Säugling übertragen werden (Brambell, 1970), gibt die Henne Antikörper in das Ei ab, aus dem der Embryo sie dann aufnimmt (Brambell, 1970). Nur wenige Studien beschreiben diese Vorgänge im bebrüteten Ei und dies ausnahmslos beim Haushuhn (Übersicht bei Rose und Orlans, 1981).

1.3.1. Immunglobulin G

Die höchsten Serumkonzentrationen der drei Immunglobuline des Haushuhns erreicht das IgG (Leslie und Clem, 1969; siehe auch Tabelle 2). Es wird selektiv (Patterson et al., 1962a und b) und aktiv (Kowalczyk et al., 1985) über das Follikelepithel aus dem Serum der Henne in den Dotter sezerniert. Ab dem 7. Entwicklungstag wird dieses IgG über die Dottersackzirkulation in den embryonalen Kreislauf aufgenommen. Die Resorption steigt aber erst in den letzten 3 Tagen vor dem Schlupf drastisch an (Kaminski und Durieux, 1956; Kramer und Cho, 1970; Kowal-

czyk et al., 1985).

Am 4. Tag der Inkubation ist es auch im Eiklar zu finden (Kramer und Cho, 1970), wobei der Ursprung dieses Immunglobulins IgG noch ungeklärt ist. Allgemein wird angenommen, daß es dem Dottersackinhalt entstammt (Rose und Orlans, 1981). Ab dem 12. Tag ist IgG in der Amnionflüssigkeit und ab dem 19. Tag auch im Darminhalt des Embryos nachweisbar (Kramer und Cho, 1970; Rose et al., 1974). Hierher gelangt es wahrscheinlich mit dem Eiklar, wenn sich dieses, nach der Perforation der sero-amniotischen Verbindung, in die Amnionflüssigkeit ergießt (Fischer, 1972). Wie beschrieben, wird es dann mit der Amnionflüssigkeit abgeschluckt und gelangt so in den Verdauungstrakt. Diesen Vorgang vergleichen Rose et al. (1974) mit der Übertragung von kolosalen Antikörpern beim Säugetier.

1.3.2. Immunglobulin M und A

Obwohl Yamamoto et al. (1975) sehr geringe Mengen der Immunglobuline IgM und IgA im Dotter frisch gelegter Eier qualitativ erfassen konnten, besteht in der übrigen Literatur Einigkeit darüber, daß weder IgM noch IgA im Dotter enthalten sind (Übersichten bei Higgens, 1975; Rose und Orlans, 1981). IgA, jedoch kein IgM, konnte Rammensee (1984) in Dotterproben von Hennen mit einer erblichen Dysgammaglobulinämie quantitativ bestimmen. Auch er fand diese Immunglobuline nicht bei immunologisch intakten Tieren. Beide Immunglobuline sind dagegen im Eiklar gut erfaßbar. Wie diese in das Eiklar gelangen ist bisher unbekannt. Ebenso wie das IgG findet man am 12. Tag der Inkubation IgM und IgA in der Amnionflüssigkeit und ab dem 19. Tag auch im Darm des Embryos (Rose et al., 1974). Eine Reihe von Autoren beschreiben zu diesen Zeitpunkten spezifische Antikörper gegen Bakterien und Viren in diesen Kompartimenten, ohne sie einer bestimmten Antikörperklasse zu zuordnen (siehe dazu Rose und Orlans, 1981).

Das Auftreten von IgM-Antikörpern im Dottersack von frisch geschlüpfen Küken haben Löscher und Schumacher (1971) bereits beschrieben. Rammensee (1984) nennt den 14. Tag der Inkubation als frühesten Zeitpunkt, zu dem IgM und darüber hinaus auch IgA im Dottersackinhalt festzustellen sind.

Die hier beschriebenen Vorgänge, Erkenntnisse und Vermutungen sind in den Tabellen 1 und 2 noch einmal zusammengefaßt.

Tabelle 1

Verteilung der Immunglobuline im frisch gelegten Hühnerei und während der Inkubation

Immunglobulin	im	Herkunft	zu messen ab dem	Übertragung via	Literatur
IgG	Dotter	Serum der Henne	-	Follikel- epithel	Patterson et al. (1962a)
	Serum des Embryos	Dottersack	12.Tag	Dottersack- gefäße und Portalvenen- blut	Kaminski und Durieux (1956) Kramer und Cho (1970)
	Eiklar	Dottersack?	4. Tag	Dottersack- umbilicus	Kramer und Cho (1970) Rose et al. (1974)
	Amnion- flüssigkeit	Dotter via Eiklar	12.-14. Tag	Sero- amniotische Verbindung	Kramer und Cho (1970) Rose et al. (1974)
	Darm	Amnion- flüssigkeit und Dotter	19.Tag	Abschlucken von Amnion- flüssigkeit Dottersack- stiel	Rose et al. (1974) Jordanov und Anastassova- Kristeva (1963)
IgM, IgA	Eiklar	Sekret des Eileiters (aus dem Serum?)	-	unbekannt	Rose et al. (1974)
	Amnion	Eiklar	12.bzw.17. Tag	Sero- amniotische Verbindung	Rose et al. (1974)
	Darm	Amnion- flüssigkeit	19. Tag	Abschlucken von Amnion- flüssigkeit	Rose et al. (1974)
	Dottersack	Eiklar? Synthese durch den Embryo?	14. Tag	unbekannt	Lösch und Schumacher (1971) Rammensee (1984)

Die mit einem Fragezeichen(?) versehenen Anmerkungen stellen Vermutungen dar.

Tabelle 2

Immunglobulinkonzentrationen im Serum, Ei, Embryo und Küken
des Haushuhns in mg/ml

Immunglobulin des im		IgG	IgM	IgA	Literatur
Serum	Haushuhns	4,3-36	-	-	Warner et al. (1969)
		5,29	0,71	-	Leslie und Clem (1970)
		4,6-21	-	-	Lösch (1972)
		6	1,3	0,6	Rose et al. (1974)
		5,5	2,55	0,37	Lebaocq- Verheyden et al. (1974)
		5	>1,25	0,35	Leslie et al. (1976)
		4,96	1,36	0,36	Rammensee (1984)
		7,3			Jürgens (1987)
Dotter	unbebrüteten Eies	20-25	-	-	Rose et al. (1974) *)
		2,93	-	-	Rammensee (1984)
		8,6	-	-	Jürgens (1987)
Eiklar		-	0,15	0,7	Rose et al. (1974)
		-	0,044	0,08	Rammensee (1984)
Dottersack	14 Tage be- brüteten Eies	3,95	<0,01	<0,005	Rammensee (1984)
Eiklar		0,04	0,08	0,05	Rammensee (1984)
Amnion- flüssigkeit	12 Tage be- brüteten Eies	<0,003	0,013	<0,03	Rose et al. (1974)
	14 Tage be- brüteten Eies	0,02	0,07	0,02	Rammensee (1984)
	17 Tage be- brüteten Eies	0,03	0,1	>0,3	Rose et al. (1974)
Darminhalt	19 Tage be- brüteten Eies	>0,05	>0,2 mg/Embryo	>0,15	Rose et al. (1974)
Serum	Eintagküken	3,1	<0,01	<0,005	Rammensee (1984)
Dottersack		2,46	0,34	0,11	Rammensee (1984)

*) : der Wert wurde bei nicht immunisierten Hennen bestimmt

1.4. Literatur zur Immunglobulinsynthese und -sekretion durch den Hühnerembryo und das Küken

Der Nachweis von IgM im Dottersack des Eintagküken (Lösch und Schumacher, 1971) ließ die Autoren eine Immunglobulinsynthese und -sekretion durch den Hühnerembryo vermuten. Diese These wurde von Rammensee (1984) durch seine quantitativen Untersuchungen am Hühnerei und Embryo erhärtet. Er fand bei dem Vergleich verschiedener Entwicklungsstadien einen Anstieg der IgM-Gesamtmenge, bei gleichbleibender IgA-Menge, ab dem 14. Tag der Inkubation.

Weitere Hinweise auf eine Bildung und Sekretion von Immunglobulinen durch den Hühnerembryo geben frühe Arbeiten, die sich mit dem Nachweis spezifischer Antikörper befaßten. 1966 beschrieb Solomon den Nachweis von opsonisierenden Antikörpern gegen Ziegenerythrozyten. Geringe Aktivitäten dieser Antikörper fand er bei Gabe hoher Antigendosen ab dem 15. Tag der Embryonalentwicklung; sicher war er sich seiner Aussage aber erst ab dem 17-19. Tag (Solomon, 1966 a und b).

Seto und Henderson (1968) untersuchten die Bildung von hämagglutinierenden Antikörpern gegen 5 verschiedene Säugererythrozyten. Sie fanden bei einigen Küken im Alter von einem Tag und bei nahezu allen sieben Tage alten Tieren solche Antikörper. Dagegen konnten sie bei 15 und 18 Tage alten Embryonen keine Hämagglutination nachweisen und bemerkten, daß es zur Klärung der Frage, ob der Embryo bereits humorale Antikörper bildet, weiterer Untersuchungen bedarf.

Eine Zusammenfassung der Erkenntnisse zur Bildung humoraler Antikörper beim Huhn gibt Solomon (1971).

Mit der Entwicklung xenogener Antiseren gegen Hühnerimmunglobuline fand die Untersuchung embryonaler Zellen auf die Expression von Oberflächenantigenen mit Immunglobulinstruktur und das Auftreten zytoplasmatischer Immunglobuline großes Interesse.

Kincade und Cooper (1971) beschrieben μ -Ketten und L-Ketten enthaltende Zellen am 14. Tag der Embryonalentwicklung in der Bursa; IgG enthaltende Zellen fanden sie dort erst am 21. Tag der Inkubation. Bereits am 12. Tag konnten Lydyard et al. (1976) Zellen mit membrangebundenem IgM in der Bursa Fabricii nachweisen.

Außerhalb der Bursa sind immunglobulinexprimierende Zellen erst einige Tage später zu finden. Kincade und Cooper (1971) nennen den 17. Tag der Embryonalentwicklung für den Nachweis von μ -Ketten positiven Zellen in der Milz und in den Caecaltonsillen. δ -Ketten positive Zellen wiesen

sie ab dem 4. Tag nach dem Schlupf nach.

Auch Albini und Wick (1975) finden in Übereinstimmung damit um den 14. Tag in der Bursa Zellen, die IgM im Cytoplasma enthalten ($cIgM^+$). Im Dottersack wiesen sie bereits am 5. Tag der Inkubation Zellen nach, die IgA auf der Zelloberfläche tragen ($sIgA^+$) und werden darin durch die Arbeit von Lebacqz-Verheyden et al. (1979) bestätigt. Am 7. Bruttag finden sie $sIgM^+$ -Zellen im Dottersack, $sIgG^+$ -Zellen in der Bursa am Tag 16.

Weitere Untersuchungen wurden von Lydyard et al. (1976), Hoffmann-Fezer und Lösch (1983), Ratcliffe et al. (1986) und Grossi et al. (1977) durchgeführt. Die letztgenannten Autoren fanden am 12. Tag der Embryonalentwicklung Zellen, die $sIgM$ und $cIgM$ positiv sind und beschrieben 3 Entwicklungsstadien der B-Zellen in der Bursa. Im 1. Stadium (Typ 1) ist $cIgM$ diffus verteilt, im 2. Stadium (Typ 2) in Kernnähe und im Golgiapparat und im 3. Stadium (Typ 3) in sekretorischen Vesikeln in Zellmembrannähe zu finden. Die Typ 3-Zelle sehen sie als sekretorische Zelle an und finden eine gute, zeitliche Übereinstimmung mit den Befunden von Thorbecke et al. (1968).

Diese Autoren wiesen in vitro eine IgM-Synthese durch Bursazellen, die am 18. Tag der Embryonalentwicklung entnommen wurden, nach. Bereits 1965 beschrieben Read et al. die Synthese von Serumproteinen durch Hühnerembryonen verschiedener Entwicklungsstadien. Sie fanden dabei Proteine, die in ihren elektrophoretischen und antigenen Eigenschaften den γ -Globulinen entsprachen.

Die von Marinkovich und Baluda (1966) publizierte Arbeit zeigt auf, daß embryonale Hühnerzellen in der Zellkultur ein Protein bilden, das auf Grund seiner antigenen und chemisch-physikalischen Eigenschaften ein γ -M Globulin ist. Sie arbeiteten mit Zellen, die am 16. Tag der Inkubation aus dem Dottersack, der Bursa und der Oberschenkelmuskulatur entnommen worden waren. Auch Lifter et al. (1976) zeigten in vitro eine deutliche Immunglobulinsynthese durch B-Zellen aus der Bursa und der Milz von Hühnerembryonen und Eintagküken.

In vivo wurde eine Immunglobulinsekretion erst einige Zeit später nachgewiesen. Lösch (1972) fand IgM im Serum von Hühnerküken schon im Verlauf der ersten 24 Stunden nach dem Schlupf, Martin und Leslie (1973) erst ab dem 4. Lebenstag. Der Nachweis von Serum-IgA gelang den letztgenannten Autoren vom 10.-12. Tag an.

Wegen der hohen Konzentrationen an maternalem IgG im Serum der Hühnerembryonen und Küken (siehe Punkt 1.3.1.) konnte der Beginn der IgG-Sekretion bisher nicht genau bestimmt werden (Rose und Orlans, 1981).

Leslie (1975) fand bei einigen Küken, die von einer Henne mit einer schweren IgG-Dysgammaglobulinämie abstammten, ab dem 3.-6. Lebenstag IgG im Serum. Khattab und Craig (1970) konnten mit Hilfe von anti-Allotyp Antiseren am 11. Lebenstag neugebildetes IgG nachweisen. Die hier genannten Untersuchungen zur Ontogenese des aviären B-Zellsystems zeigen, daß eine Immunglobulinsynthese, die durch das Auftreten cytoplasmatischer und membrangebundener Immunglobuline erkennbar wird, bereits einige Zeit vor dem Schlupf erfolgt. Eine Sekretion dieser Immunglobuline während der Embryonalentwicklung konnte in vivo bisher jedoch nicht nachgewiesen werden, obwohl einige der aufgeführten Arbeiten darauf hinweisen.

1.5. Literatur zur Bursektomie des Haushuhns

Zur Beantwortung der weiter unten gestellten Fragen dieser Arbeit, sollten agammaglobulinämische Hennen bis zur Legereife aufgezogen werden. Durch die Entfernung der Bursa Fabricii (Bursektomie) ist es möglich das aviäre Immunsystem so stark zu schädigen, daß eine Immunglobulinsynthese bei diesen Tieren ausbleibt.

Mehrere Techniken zur Eliminierung oder Funktionsunterdrückung der Bursa Fabricii sind bisher entwickelt worden.

Neben der chirurgischen Entfernung (Glick et al., 1956), die in immer früheren Stadien der Embryonalentwicklung durchgeführt wird (Granfors et al., 1982), wurden Methoden zur chemischen Bursektomie gefunden. Glick und Sadler (1961), Merckenschlager et al. (1966) und Lehner et al. (1971) konnten durch hormonelle Zerstörung des Bursaepithels mit Testosteron eine schwere Dys- bzw. Agammaglobulinämie erzeugen.

Cyclophosphamidinjektionen in das geschlüpfte Küken bewirken die Zerstörung der sich rasch entwickelnden B-Zell-Linie (Glick, 1971; Linna et al., 1972; Lehmann und Weidanz, 1970). Eine Kombination beider Techniken (Weidanz et al., 1971) führt zu einer größeren Zahl definitiv agammaglobulinämischer Tiere, die auch in späteren Entwicklungsstadien die Fähigkeit zur Immunglobulinsynthese und -sekretion nicht wiedererlangen.

Literaturübersichten zu diesen und weiteren Techniken finden sich bei Glick und Mc Duffie (1975) und Toivanen und Toivanen (1987).

1.6. Fragestellungen der Arbeit

Der bisher ungeklärte Ursprung der Immunglobuline IgM und IgA im Dottersack des Eintagküken sollte in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden.

Der Arbeit wurde die von Lösch und Schumacher (1971) aufgestellte Hypothese einer Immunglobulinsynthese und -sekretion in embryonalem oder extraembryonalem Gewebe zu Grunde gelegt.

Der Nachweis neu gebildeter Immunglobuline wird aber während der Entwicklung im Ei und auch nach dem Schlupf durch maternale Immunglobuline erschwert (Rose und Orlans, 1981).

In Anlehnung an Rammensees (1984) Ausführungen sollte zunächst ein Vergleich der IgM- und IgA-Mengen im Eiklar des frisch gelegten Eies mit denen im Dottersack des kurz vor dem Schlupf stehenden Embryos erfolgen, um so eine Zunahme der Gesamtmengen aufzeigen zu können.

Eine quantitative Untersuchung des Dotterimmunglobulins IgA wurde den Untersuchungen vorangestellt. Außer der bereits genannten qualitativen Untersuchung von Yamamoto et al. (1975), ist in der Literatur in keinem Fall eine Angabe über Dotter-IgA Konzentrationen zu finden.

Ein Vergleich der Molekulargewichte beider Immunglobuline in diesen Kompartimenten sollte weiteren Aufschluß über deren physikalisch-chemische Eigenschaften geben, um über den Polymerisationsgrad auf das Auftreten neugebildeter Immunglobuline schließen zu können.

Um eine Synthese und Sekretion der Immunglobuline direkt nachweisen zu können, sollten, parallel zu den bereits genannten Untersuchungen, agammaglobulinämische Hennen bis zur Legereife aufgezogen werden.

Da die Eier dieser Tiere keine maternalen Immunglobuline enthalten können, läßt sich an Nachkommen dieser Hennen eine Eigensynthese sicher nachweisen.

Darüberhinaus kann der Beginn einer Immunglobulinsynthese und -sekretion zeitlich genau bestimmt werden. Leslie (1975) und Rose und Orlans (1981) wiesen insbesondere auf die Schwierigkeit hin, den von maternalen Antikörpern dieses Isotyps (siehe Punkt 1.3.1.) überlagerten Beginn der IgG-Bildung beim Küken festzulegen.

Durch die intravenöse Injektion einer hochkonzentrierten Lösung der Immunglobuline IgM und IgA in das Blut agammaglobulinämischer Hennen sollte der bisher ungeklärte Vorgang der Sekretion dieser Immunglobulin-Isotypen in das Eiklar genauer untersucht werden.

Zugleich ergab sich die Möglichkeit die Halbwertszeiten dieser Serum-immunglobuline zu bestimmen und aus dem Verlauf der Eliminationskurven auf eine Verteilung der injizierten Immunglobuline in andere Kompartimente zu schließen.

Während über die Halbwertszeiten des Immunglobulins IgG zahlreiche Arbeiten vorliegen (Patterson et al. 1962; Ivanyi et al. 1964; Herlyn et al., 1977; Leslie und Clem, 1970), bestimmten nur die letztgenannten Autoren die Werte für das IgM. Die IgA-Halbwertszeiten wurden bisher beim Huhn nicht bestimmt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiermaterial und Tierhaltung

In der Arbeit wurden ausschließlich Hennen und Hähne der Linie Lohmanns-Selected-Leghorn (LSL) verwendet. Legereife Hennen und befruchtete Eier wurden von der Fa. Lohmann (Gut Heinrichsruh, Oberhummel) bezogen.

Die Tiere wurden auf Gitterrosten unter konventionellen Bedingungen gehalten, mit handelsüblichem, pelletiertem Futter für die jeweilige Lebensperiode ernährt. Dies stand, ebenso wie das Trinkwasser, ad libitum zur Verfügung.

Die Brut erfolgte in einem vollautomatischen Brüter (Fa. Grumbach, Wetzlar). Die Küken erhielten am 1., 2., 3. und 28. Lebenstag über das Trinkwasser Tylosintartrat (ad us. vet., Fa. Ely Lilly) in einer Konzentration von 0,5 g/l.

2.2. Chemische Bursektomie

120 Eier wurden in vier gleich große Gruppen geteilt, zunächst zur Oberflächendesinfektion mit 2%-iger Peressigsäure behandelt und anschließend in den desinfizierten Brüter eingelegt.

Am 3. Tag der Inkubation wurden 90 Eier für 5 Sekunden 3,7 cm tief mit dem spitzen Pol in eine 5°C kalte, äthanolische Testosteronpropionatlösung (TP; Testosteronpropionat, Fa. Sigma, Deisenhofen) unterschiedlicher Konzentration getaucht (Glick und Sadler, 1961).

Am 1., 2., 3. und 4. Tag nach dem Schlupf erhielten die Tiere gemäß dem folgenden Schema jeweils 0,3 ml einer 1%-igen Cyclophosphamid-Lösung (CP; Cyclostin 1000, Fa. Famitalia Carlo ERBA GmbH, Freiburg) in die Oberschenkelmuskulatur injiziert (Lerman und Weidanz, 1970; Mc Arthur et al., 1972).

Behandlungsschema für die chemische Bursektomie

Gruppe		I	II	III	IV
Testosteronpropionat (Konzentration der Lösung)		2%	1%	-	-
Tag der Injektion	1.	0,3	0,3	0,3	-
von Cyclo-	2.	0,3	0,3	0,3	-
phosphamid	3.	0,3	0,3	0,3	-
(ml/Injektion)	4.	-	-	0,3	-

2.3. Aufzucht und Haltung der bursektomierten Tiere

Am 18. Tag der Brut wurde ein Teil der befruchteten Eier erneut mit 2%-iger Peressigsäure oberflächendesinfiziert und anschließend in sterile V_2A - Keimfreieinheiten eingeschleust. Diese Tiere wurden unmittelbar nach dem Schlupf im Isolator gekennzeichnet und mit Cyclophosphamid, wie oben beschrieben, behandelt. Sie konnten sich in den 150x70x70 cm großen Keimfreieinheiten frei bewegen. Im übrigen erfolgte die Haltung und Kontrolle wie von Merckenschlager et al. (1967) und Lösch et al. (1970) beschrieben.

Die übrigen Eier wurden im Brutschrank bis zum Schlupf inkubiert, die Küken dieser Gruppe in einem separaten Tierstall (Isolierstall), der zuvor noch nicht mit Hühnern belegt war, aufgezogen.

Das folgende Schema zeigt die Aufteilung der unter Punkt 2.2. beschriebenen Gruppen in die einzelnen Haltungsformen.

Gruppe Nr.	I	II	III	IV
Behandlung: % TP	2%	1%	-	-
ml CP	3x0,3	3x0,3	4x0,3	-
Isolator Nr.1	10 Eier		5 Eier	5 Eier
Isolator Nr.2		10 Eier	5 Eier	5 Eier
Tierstall	7 Küken	14 Küken	6 Küken	3 Küken

Von den in den Isolatoren gehaltenen Tieren verblieben am 60. Tag noch je 5 Tiere in den Einheiten. Diese wurden am 90. Tag ebenfalls ausgeschleust und mit den übrigen Tieren im separaten Tierstall aufgezogen.

Am Tag der Konventionalisierung wurde bei allen Tieren die erste Blutprobe entnommen. Tiere, die im Verlaufe des Versuches starben, wurden am Institut für Geflügelkrankheiten der Universität München (Mittenheimerstr. 54, 8042 Oberschleißheim), untersucht.

Die Hennen, die die Legereife erreichten, erhielten täglich etwa einen Teelöffel eines Sauermilchproduktes zur freien Aufnahme angeboten. Sinn dieser Fütterung sollte eine positive Beeinflussung der Darmflora durch die Milchsäurebakterien sein (persönliche Mitteilung von Frau Prof. Gerlach, Institut für Geflügelkrankheiten).

2.4. Injektion der antikörperhaltigen Lösungen

Zwei agammaglobulinämische Hennen erhielten hochkonzentrierte Lösungen der Hühnerimmunglobuline IgM und IgA intravenös verabreicht.

Die Proteinlösungen wurden zunächst 3x24 Stunden bei 4° C gegen Ring-Lösung (DAB 7) dialysiert. Kurz vor der Injektion wurde sie 15 Minuten bei 45000 g zentrifugiert und anschließend mittels einer Einmalspritze durch einen Sterilfilter (Minisart SM 16534, Fa. Sartorius, Göttingen) in ein sterilisiertes Glasgefäß gepreßt und aus diesem in eine sterile Einmalspritze aufgenommen.

0,2 ml dieser Lösung wurden in einem Reaktionsgefäß bei -20° C eingefroren, um später die IgM- und IgA-Konzentrationen vor der Verabreichung bestimmen zu können.

Die Injektionen erfolgten in die Vena jugularis. Das Huhn wurde von einer zweiten Person fixiert, der Hals gestreckt und mit 70%-iger Alkohollösung desinfiziert. Das nach dem Stauen deutlich erkennbare Gefäß konnte problemlos punktiert werden. Zunächst wurde eine Blutprobe gewonnen und anschließend die Lösung, mit einem Volumen von 8,5 bzw. 8,8 ml langsam, im Verlaufe von 2 Minuten, verabreicht. Eine Minute später wurde die erste Blutprobe an der Vena cutanea ulnaris entnommen. Weitere Entnahmen erfolgten nach 8, 24 und 48 Stunden und dann täglich bis zum 14. (Henne Nr. 167) bzw. 11. (Henne Nr. 290) Tag nach der Injektion.

Am Tag vor dem Versuchsbeginn und im Versuchszeitraum gelegte Eier wurden gesammelt und sofort, wie unter Punkt 2.5.2. und 2.5.3. be-

schrieben, präpariert.

2.5. Probengewinnung und Probenaufarbeitung

2.5.1. Serumproben

Blut wurde aus der Vena cutanea ulnaris entnommen, 3 Stunden bei 37° C und anschließend über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach zehnmündiger Zentrifugation bei 1000 g, wurde das Serum abpipettiert und bis zur Messung bei -20° C eingefroren.

Die Blutproben der frisch geschlüpften und sehr jungen Küken (bis zur 3. Lebenswoche) wurden ebenfalls aus der Vena cutanea ulnaris entnommen. Nach Punction des Gefäßes mit einer sterilen Einmalkanüle (TSK-Supra Nr.1 0,90x38 mm) konnte der vorquellende Blutropfen mit einer Kolbenhubpipette aufgenommen und in ein 1 ml Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf, Hamburg) gegeben werden. Bei den Küken wurden so alle 2 Tage 40-60 µl Blut gewonnen.

2.5.2. Dotterproben

Der Dotter wurde mit einem Löffel vom Eiklar getrennt und so lange auf Filterpapier abgerollt, bis die Membrana vitellina frei von Eiklar war.

Anschließend wurde die Membran geöffnet, der vorquellende Inhalt vollständig gesammelt und das Volumen bestimmt. Die Proben wurden nach der von Jensenius et al. (1981) beschriebenen Methode entfettet und, wenn nötig, nach der selben Vorschrift durch Natriumsulfatfällung weiter gereinigt und konzentriert.

2.5.3. Eiklarproben

Nach dem Abtrennen des Dotters mußten die Eiklarproben, wie von Rose et al. (1974) beschrieben, präpariert werden, um für die weiteren Untersuchungen eine pipettierbare Lösung zu erhalten.

Zunächst erfolgte eine Muzinfällung, indem der pH-Wert des Eiklars mit 0,05 M Schwefelsäure auf 4,5 eingestellt wurde. Vor der Zentrifugation (bei 3000 g) dieser Suspension wurde deren Volumen bestimmt.

Hieran schloß sich, nachdem der pH-Wert mit 0,1 M NaOH auf 7,0 zurückgestellt worden war, eine Fällung der Globulinfraktion aus dem Überstand des Zentrifugates an. Die Lösung wurde mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung (Ammoniumsulfat p.A., Fa. Merck, Darmstadt) zu gleichen Teilen versetzt, bei 4° C für 30 Minuten gerührt und erneut zentrifugiert. Das Sediment konnte in PBS aufgenommen werden.

2.5.4. Dottersackproben

Am 21. Tag der Brut, zu diesem Zeitpunkt hatten die ersten Tiere bereits die Eischale angepickt, wurden die Eier in eine Ätherkammer gelegt und bis zum Tod der Embryonen darin belassen.

Der Embryo wurde anschließend aus dem Ei präpariert. Durch einen Schnitt median in der Leistengegend wurde die Bauchhöhle geöffnet, wobei unter leichtem Druck auf das Abdomen und vorsichtigem Zug mit einer anatomischen Pinzette am Dottersack, dieser bis zum Dottersackstiel aus dem Abdomen hervorgeholt und dann dort abgesetzt wurde. Beim 16 Tage alten Embryo lag der Dottersack noch extraembryonal und konnte somit gleich am Dottersackstiel durchtrennt werden. Zur weiteren Präparation wurde der ganze Dottersack, also Inhalt und Membran in einen Homogenisatorzylinder gegeben und mit 3 ml PBS aufgefüllt. Die Probe wurde nun homogenisiert (Homogenisator Potter S, Fa. Braun, Melsungen), das Volumen bestimmt und das Dottersackvolumen durch Subtraktion des Puffervolumens errechnet.

Hieran schloß sich, nach der quantitativen Überführung in einen Zentrifugenbecher, eine Fettfällung an.

Die Probe wurde mit 1 ml einer 10%-igen Dextransulfatlösung (Dextransulfat 500 Na-Salz, Spezialqualität für die Präzipitation von Lipoproteinen, Fa. Serva, Heidelberg) versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Überschüssiges Dextransulfat konnte durch Zugabe von 1 ml einer 1 M CaCl_2 (Fa. Merck) und erneutem Rühren für 10 Minuten bei Raumtemperatur aus der Probe gefällt werden. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 12000 g trennten sich die Fettfraktion und die wässrige Phase, deren Volumen bestimmt wurde. Bis zur Messung wurde sie bei -20° C eingefroren.

Durch Multiplikation der immunoelektrophoretisch (Rocket-Immunoelektrophorese) bestimmten Konzentrationen mit dem Volumen des wässrigen Überstandes wurde die Gesamtmenge der Immunglobuline im Dottersack

ermittelt. Nach Division dieses Wertes durch das anfangs errechnete Dottersackvolumen, ergaben sich die Konzentrationen der Immunglobuline, ausgedrückt in mg/ml Dottersackvolumen.

Dottersackproben der von einem Elterntier stammenden Nachkommen wurden vereinigt und zur weiteren Konzentrierung mit gleichen Teilen einer gesättigten Ammoniumsulfat versetzt, bei 4° C 30 Minuten gerührt, 15 Minuten bei 3000 g zentrifugiert und das Sediment in 2 ml PBS pro eingesetzter Dottersackpräparation aufgenommen. Die Proben wurden so etwa 5-fach konzentriert.

2.5.5. Amnion- und Allantoisflüssigkeit des 16 Tage alten Embryos

Das bebrütete Ei wurde mit dem spitzen Pol nach unten gerichtet aufgestellt, am stumpfen Pol geöffnet und die Schalenhaut vorsichtig abgehoben. In eine Einmalspritze konnte nun zunächst Allantoisflüssigkeit aufgezogen werden. Anschließend wurde der Embryo vorsichtig aus dem Ei herausgezogen und auf eine Petrischale gelegt. Mit einer zweiten Spritze konnte das Amnion punktiert und der Inhalt gewonnen werden.

2.6. Herstellung der Antiseren

H-Ketten spezifische Antiseren wurden nach der von Lösch et al. (1981) beschriebenen Methode im Kaninchen produziert.

Für das Immunoblotting wurden diese Antiseren affinitätschromatographisch weiter gereinigt. Zunächst erfolgte eine Fällung der IgG-Fraktion aus dem Kaninchenserum nach der Vorschrift von Johnstone und Thorpe (1987). Das Sediment wurde in Startpuffer für die Affinitätschromatographie aufgenommen und 2x24 Stunden gegen den selben Puffer dialysiert.

Hoch gereinigtes IgM und IgA wurden nach der Herstellervorschrift an cyanbromidaktivierte Sepharose 4B gekoppelt. Die in Startpuffer vorliegenden Kaninchen anti-Hühner-IgM oder anti-Hühner-IgA Antikörper wurden nun auf die entsprechenden Gele aufgetragen. Die weiteren Wasch- und Elutionsschritte erfolgten wie unter Punkt 2.7.1.2. beschrieben.

Die Eluate mehrerer Säulenläufe wurden gesammelt und in der radialen Immunodiffusion auf das Vorhandensein von anti-IgM und anti-IgA Antikörpern überprüft. Deren Spezifität konnte im Immunoblotting aufgezeigt werden. Die Konzentration der Antikörperlösung für das Immuno-

blotting betrug 1mg Protein pro ml Lösung.

2.7. Reinigung der Immunglobuline

2.7.1. Gewinnung von Standard-Reinsubstanzen

2.7.1.1 Immunglobulin A

IgA wurde in der von Rammensee (1984) beschriebenen Weise aus Galle gereinigt. Diese wurde auf einem Hühnerschlachthof während des Schlachtvorganges gewonnen und bis zur Aufarbeitung eingefroren.

Nach 2x24-stündiger Dialyse der Gallenflüssigkeit gegen 0,1 M Na-Acetatpuffer pH 5,0 konnten die ausgefallenen Muzine bei 12000 g abzentrifugiert werden. Der Überstand wurde zu gleichen Teilen mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, wodurch die immunglobulinhaltige Fraktion während des Rührens bei 4° C (30 Minuten) ausfiel. Das Sediment der anschließenden Zentrifugation bei 3000 g löste sich gut in 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0 und konnte so an Ultrogel AcA 22 (Fraktionierungsbereich 100.000-1.200.000 Dalton, Fa. LKB, Schweden) chromatographiert werden. Der Säulendurchmesser betrug 1,6 cm, das Gelbettvolumen 170 ml, die Fließgeschwindigkeit 5 ml pro Stunde. Der erste Peak des Eluates enthielt reines IgA. Die Fraktionen unter diesem Peak wurden in einer Magnetrührzelle (Fa. Amicon, Witten) konzentriert. Für den Membranfilter (SM 14669, Fa. Sartorius, Göttingen) ist die Trenngrenze bei einem Molekulargewicht von 100.000 Dalton angegeben.

2.7.1.2. Immunglobulin M

IgM wurde aus dem Serum dysgammaglobulinämischer Hühner der UM-B19 Linie (Lösch et al., 1981) gereinigt. Diese Tiere zeigen besonders hohe Serum IgM-Werte. Das Serum wurde zunächst entfettet. 10 ml Serum und 0,4 ml einer 10%-igen Dextransulfatlösung wurden gemischt und bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter Rühren inkubiert, anschließend mit einem ml einer 1 M CaCl₂ versetzt und nach weiteren 10 Minuten bei 12000 g zentrifugiert. Aus dem Überstand konnte die Globulinfraktion durch 50%-ige Sättigung mit Ammoniumsulfat nach 30-minütiger Inkubation bei 4° C gefällt werden.

Zur weiteren Reinigung wurde das Sediment in 0,1 M Phosphatpuffer aufgenommen und an Aca 22 im gleichen Puffer chromatographiert. Die Säule hatte einen Durchmesser von 2,6 cm, ein Gelbettvolumen von 420 ml und die Fließgeschwindigkeit betrug 5 ml pro Stunde. Es wurden jeweils 4 ml der Proteinlösung aufgetragen. Der erste Peak des Eluates, der neben IgM auch IgA enthielt, wurde anschließend in einer Magnetrührzelle (siehe Punkt 2.7.1.1.) konzentriert.

Für den unter Punkt 2.4. beschriebenen Versuch mußte das Konzentrat noch 3x24 Stunden gegen Ringer-Lösung dialysiert werden, um zum einen die Immunglobuline in einem physiologischen Puffer vorliegen zu haben und zum anderen das Natriumazid des Elutionspuffers zu entfernen.

Hochgereinigtes IgM wurde nach Affinitätschromatographie des gelchromatographischen Eluates erhalten. 2 mg H-Ketten spezifischer Antikörper wurden nach der Vorschrift von Pharmacia (Affinity Chromatography, Pharmacia, Freiburg) pro ml cyanbromidaktivierter Sepharose 4B (Fa. Pharmacia, Freiburg) gekoppelt. Der pH Wert des Kopplungspuffers betrug 8,5, überschüssige aktive Gruppen wurden mit Glycin geblockt.

Das Konzentrat aus der Magnetrührzelle wurde 2x24 Stunden gegen Startpuffer für die Affinitätschromatographie dialysiert, bevor es bei Raumtemperatur auf die Säule aufgetragen wurde. Die Extinktionen des Durchlaufes und der Eluate wurden bei 280 nm gemessen. Nach dem Auftrag wurde so lange mit Startpuffer gewaschen, bis im Durchlauf keine Extinktion mehr zu messen war. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 2 M NaCl desorbiert und die spezifisch gebundenen Proteine mit Glycin-HCl Puffer pH 2,5 eluiert. Es wurden 1 ml Fraktionen aufgefangen und der pH Wert sofort mit 50 μ l einer 1 M Tris-Lösung hochgestellt, um ein Denaturieren der Proteine zu vermeiden. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden bei 280 nm bestimmt, vereinigt und in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) weiter beurteilt.

2.7.1.3. Immunglobulin G

Reines Hühner-IgG wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen) bezogen. Es enthielt nach Herstellerangaben 5 mg IgG pro ml Lösung (Proteinbestimmung nach Lowry).

2.7.2. Gewinnung von Eiklarimmunglobulinen

Eiklarpräparationen, die nach der unter Punkt 2.5.3.1. beschriebenen Technik hergestellt worden waren, wurden, wie für das Serum beschrie-

ben, an Ultrogel AcA 22 gereinigt. Die IgA-haltigen Fraktionen wurden in der Rocket-Immunelektrophorese bestimmt, vereinigt und in einer Magnetrührzelle (s.o.) konzentriert.

Eine IgM-reiche Fraktion wurde aus dem Eiklar einer Henne gewonnen, die keine meßbaren Serum-IgA Werte zeigte und auch im Eiklar keine IgA-Titer aufwies. Die Reinigung erfolgte wie für das IgA beschrieben.

2.7.3. Gewinnung von Dottersackimmunglobulinen

Entfetteter Dottersackinhalt (siehe Punkt 2.5.4.) wurde mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung zu gleichen Teilen versetzt und 30 Minuten bei 4° C unter Rühren inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 3000 g für 20 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 0,1 M Phosphatpuffer aufgenommen, wobei das Volumen möglichst klein gehalten wurde.

Diese Lösung wurde nun ebenfalls an Ultrogel AcA 22, wie für das Serum beschrieben, chromatographiert. Die immunglobulinhaltigen Fraktionen wurden auch hier in der Rocket-Immunelektrophorese bestimmt und dann in der SDS-Page weiter untersucht.

2.8. Nachweisverfahren

2.8.1. Proteinbestimmung

Die Bestimmung erfolgte nach Lowry et al. (1951). Um Fehlmessungen durch Farbreaktionen der Puffersubstanzen auszuschließen, wurden die Proteine durch Mischen der Proben mit gleichen Teilen einer 10%-igen Trichloressigsäurelösung und Inkubation bei 4°C für 30 Minuten gefällt. Die Proben wurden 2 Minuten zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5412), der Überstand vollständig abpipettiert und verworfen, das Sediment in 0,1 M NaOH mit 10% Natrium-Dodecylsulfat (SDS) gelöst. Die Messung erfolgte im Autoanalyser II (Technikon, Bad Vilbel). Als Standardprotein wurde Rinderserumalbumin (Fraktion V, Fa. Sigma, Deisenhofen) verwandt.

2.8.2. Doppelte Immundiffusion (Ouchterlony, 1962)

Die Technik wurde zum qualitativen Nachweis von Hühnerantikörpern genutzt.

20 ml einer 1%-igen Agarosesuspension (Agarose Serva Standard EEO, Fa. Serva, Heidelberg) in Tris-Barbituratpuffer pH 8,6, wurden bis zum Kochen erhitzt und auf eine 10x10 cm große Glasplatte aufgetragen. Nach dem Erstarren des Agarosegels konnte eine Rosette mit 7 Löchern gestanzt werden. Diese wurden mit je 10 μ l des Antiserums bzw. des Antigens gefüllt und das Gel für 24 Stunden in eine feuchte Kammer zur Diffusion gegeben.

2.8.3. Rocket-Immunelektrophorese (Laurell, 1966)

Die Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen erfolgte in der Rocket-Immunelektrophorese. 1:5 verdünnter Tris-Barbituratpuffer pH 8,6 wurde mit 1% Agarose C (Pharmacia, Freiburg) versetzt, aufgekocht und auf 58° C abgekühlt. Erst dann konnten 15 ml dieser Lösung mit dem jeweiligen, H-Ketten spezifischen Antiserum zusammengegeben werden, ohne die Antikörper zu zerstören. Auch hier wurde das Gel auf eine 10x10 cm große Glasplatte aufgetragen. Nach dem Erstarren der Agarose konnten bis zu 15 Löcher im Abstand von 1,5 cm vom Rand, parallel zu diesem, gestanzt werden (Gelstanze, Durchmesser 2,0 mm, Fa. Pharmacia-LKB, Freiburg). Auf jeder Platte wurden je 5 μ l der 11 Proben bzw. 4 Standardverdünnungen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Multiphor I-Kammer (Fa. Pharmacia-LKB) bei einer Feldstärke von 1 Volt pro cm mit 1:4 verdünntem Tris-Barbituratpuffer pH 8,6 als Laufpuffer. Die Elektrodenbrücken (Filterpapier 2668/8 Fa. Schleicher und Schuell, Dassel) wurden zunächst mit Laufpuffer getränkt und dann mit den Gelen in Kontakt gebracht. Die Elektrophorese wurde nach 16 Stunden beendet, die Gele anschließend wie unter Punkt 2.8.5. beschrieben, weiterbehandelt.

Nach dem Färben wurden die Peakhöhen gemessen. Durch Auftragen der Laufstrecken der Standardverdünnungen gegen die Konzentrationen konnte eine Regressionsgerade erstellt werden, an der die Peakhöhen der zu messenden Proben abgetragen wurden. Ausgewertet wurden nur solche Gele, für die sich ein Regressionskoeffizient von 0,99 ergab.

2.8.4. Immunelektrophorese (Grabar und Williams, 1953)

Bei dieser Technik werden komplexe Antigengemische zunächst elektrophoretisch getrennt, bevor sie durch Präzipitation wie bei der Immundiffusion sichtbar gemacht werden.

Agarose Standard EEO (Fa. Serva, Heidelberg) wurde in Tris-Barbituratpuffer pH 8,6 suspendiert und bis zum Kochen erhitzt. Die Agarosekonzentration betrug 1%. 12,5 ml dieser Lösung wurden auf eine 8,5x9 cm große Glasplatte aufgetragen. Diese wurde in eine Haltevorrichtung gelegt und mit einer Schablone bedeckt. An den vorgezeigten Stellen konnten nun mit einer Gelstanze Löcher aus dem Agarosegel ausgehoben werden. Nachdem je 5 μ l der Antigenlösung in die Probenlöcher gegeben wurden, erfolgte die Elektrophorese in der gleichen Weise, wie sie unter Punkt 2.8.3. für die Rocket-Immunelektrophorese beschrieben wurde.

Nach etwa 60 Minuten wurde diese beendet und zwischen den Probenlöchern, parallel zur Laufrichtung der elektrophoretischen Trennung, mit einem Skalpell eine Rinne ausgestochen. Auch dazu konnte die Schablone benutzt werden. Die Rinne wurde mit 2 ml des Antiserums gefüllt und das Gel nun für 12-24 Stunden zur Diffusion in eine feuchte Kammer gelegt. Die Präzipitate zeichneten sich nach der Coomassie-Färbung deutlich ab.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Reinsubstanzen der Hühnerimmunglobuline mit dieser Technik auf eventuelle Verunreinigungen überprüft. Zu diesem Zweck wurden sie gegen ein polyvalentes Kaninchen anti-Hühnerserum entwickelt.

Die beschriebenen Geräte stammten von der Firma Pharmacia-LKB (Freiburg).

2.8.5. Färbetechniken für Agarosegele

Die hier beschriebenen Färbetechniken sind in gleicher Weise für die Gele der doppelten Immundiffusion, der Immunelektrophorese und der Rocket-Immunelektrophorese angewandt worden.

Zunächst waren die Gele, nach Beendigung der Diffusion bzw. der Elektrophorese, in 0,9%-iger NaCl-Lösung für 2 Stunden zu waschen. Anschließend wurden sie mit nassem Filterpapier (Whatman Nr.1, Fa.

Whatman, Maidstone/England) abgedeckt und durch Auflegen eines Gewichtes für 10 Minuten gepreßt. Bei 60° C im Brutschrank trockneten die Gele rasch ein, wurden 10 Minuten in Coomassie-Färbelösung gelegt und danach so lange in Entfärbelösung belassen bis der Hintergrund, dem Wunsch entsprechend, stark entfärbt war.

Hieran wurde, wenn nötig, eine Silberfärbung (Willoughby und Lambert, 1983; Budowle, 1984) angeschlossen. Der Hintergrund, der mit Coomassie-Lösung gefärbten Gele, mußte vollständig entfärbt sein, bevor sie für 5 Minuten in 4%-ige Glutaraldehydlösung gelegt wurden. Darauf folgten zwei Waschschrte mit destilliertem Wasser und die Färbung in der aus Lösung A und B unmittelbar zuvor hergestellten Silbernitratlösung. Sobald die Färbung zufriedenstellend war, wurde die Reaktion durch Überführen der Gele in 10%-ige Essigsäurelösung gestoppt. Zur Auswertung konnten die Präzipitate, wie nach der Coomassie-Färbung, im Durchlicht betrachtet werden.

Lagen die Glasplatten mit dem Gel nach unten auf einem schwarzen Hintergrund, so zeichneten sich die silbergefärbten Präzipitate durch Reflektion des aufscheinenden Lichtes einer Lampe noch deutlicher ab. Mit dieser Färbetechnik konnten sehr schwache, oder durch starke Verunreinigungen überdeckte, Präzipitate deutlich gemacht werden. So war es möglich die Empfindlichkeit und Genauigkeit der Methoden zu erhöhen.

2.8.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page, Laemmli, 1970)

Durch die Trennung von Proteingemischen mit Hilfe der von Laemmli (1970) beschriebenen Technik können eine Reihe von Fragen beantwortet werden.

So ist es möglich die Molekulargewichte von Proteinen zu bestimmen, Lösungen auf die Zahl und Art der in ihnen enthaltenen Proteine zu untersuchen und Proteine, z.B. durch Reduktion von Disulfidbindungen mit 2-Mercapthoäthanol, genauer zu beschreiben.

Nach Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) in den Probenpuffer werden die Proteine einheitlich negativ geladen; die Trennung im Gel wird damit ladungsunabhängig und erfolgt hauptsächlich auf Grund des Molekulargewichtes. Lediglich hoch glykosilierte Proteine verhalten sich etwas anders.

Die benutzte Elektrophoresekammer und die Gelgießkassette sind bei Johnstone und Thorpe (1987) genau beschrieben.

Um Proteine mit hohem Molekulargewicht wie beispielsweise pentameres IgM und solche mit kleinem Molekulargewicht (H- und L-Ketten der Immunglobuline) in einem Gel gut trennen zu können, wurden Porengradienten mit einer Gesamt-Acrylamidkonzentration von 3-15% hergestellt.

Die Gelgießkassette wurde fest in einen Polypropylenbeutel eingepackt und an einem Gießständer senkrecht aufgestellt. Das nachstehende Schema zeigt die Herstellung der Acrylamidlösungen.

3%-ige Lösung: 19,5 ml Aqua bidest.
 7,5 ml Gelpuffer pH 8,8
 3,0 ml Acrylamid Stammlösung

15%-ige Lösung: 7,5 ml Aqua bidest.
 7,5 ml Gelpuffer pH 8,8
 15,0 ml Acrylamid Stammlösung

Nach Zugabe von je 100 μ l einer 10%-igen Ammoniumperoxodisulfat-Lösung, mußten die Lösungen an einer Wasserstrahlpumpe kurz entgast und dann mit je 15 μ l N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED, Fa.Sigma, Deisenhofen) versetzt werden. 16 ml der 3%-igen Lösung wurden in das hintere Gefäß einer Mischkammer gegeben und die Verbindung zur Vorderkammer kurz geöffnet, um das Verbindungsstück zu füllen. 16 ml der 15%-igen Lösung kamen nun in das vordere Gefäß, welches einen Rührmagneten enthielt. Nach dem Öffnen der Kammerverbindung wurde unter Rühren die Gießkassette gefüllt und zuletzt der Taschenformer eingesetzt. Das Gel blieb bis zum Ende der Polymerisation stehen. Die Elektrophorese erfolgte in Tris-Glycin Elektrophoresepuffer, der durch 1:10 Verdünnung aus der Stammlösung hergestellt wurde. Die Proben wurden mit Probenpuffer zu gleichen Teilen gemischt, jeweils 50 μ l dieser Lösung in die Probentaschen pipettiert und mit Elektrophoresepuffer überschichtet. Sobald die Bromphenolblaubande den unteren Gelrand erreichte, wurde der Lauf beendet. Die Laufzeit betrug ca. 3 Stunden bei 40 mA und 100 Volt.

Zur Reduktion wurden die Proben mit 2-Mercapthoäthanol haltigem Probenpuffer versetzt und 3 Minuten bei 100°C inkubiert.

Ein Proteinmarkergemisch (SDS-7B, Fa. Sigma, Deisenhofen) wurde bei jedem Lauf mitgetrennt.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele entweder bei -80°C eingefroren bis sie im Immunoblotting genutzt wurden, oder sofort für

30 Minuten in Coomassie-Färbelösung gelegt, anschließend wurden sie entfärbt. Durch Erhitzen auf 60° C konnte dieser Vorgang stark beschleunigt werden.

Zur Dokumentation wurden die SDS-Polyacrylamidgele auf einen Diabildbetrachter gelegt, bis zu den Rändern mit schwarzen Matten abgedeckt und im Durchlicht mit Agfa-Ortho 25 (Fa. Agfa- Gevaert, Leverkusen) fotografiert.

2.8.7. Immunoblotting

Die immunologische Identifizierung von Proteinbanden in der SDS-Page ist erst möglich, wenn diese aus dem Gel auf eine andere Matrix transferiert (Towbin et al., 1979) und dann, ähnlich dem ELISA, von spezifischen Antikörpern erkannt werden.

Diese Technik wurde in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der IgM- und IgA-Banden, nach teilweiser oder vollständiger Reinigung der Proteine aus Serum, Eiklar und Dottersackinhalt, angewandt.

Der Transfer erfolgte mit einem Semi-dry Elektrobloetter (SM 17556, Fa., Sartorius, Göttingen). Beim Aufbau der Transfereinheit wurden stets Handschuhe getragen und Luftblasen durch Ausstreichen entfernt. Das Filterpapier und die Nitrocellulosemembran wurden genau auf die Gelgröße zugeschnitten. Das Sandwich war folgendermaßen aufgebaut.

- Auf die mit destilliertem Wasser gewaschene, anodische Graphitplatte wurden
- 6 Lagen eines mit Transferpuffer getränkten Filterpapiers (Whatman Nr.3, Fa. Whatman, Maidstone/England) gelegt und
- darauf die in destilliertem Wasser getauchte Nitrocellulosemembran (Nitrocellulose BA83, Porengröße 0,2 µm, Fa. Schleicher und Schuell, Dassel).
- Auf diese wurde das Polyacrylamidgel gelegt und darauf
- weitere 6 Lagen des gleichen Filterpapiers, das ebenfalls mit Transferpuffer getränkt wurde.
- Abschließend wurde die, mit destilliertem Wasser gewaschene, kathodische Graphitplatte aufgelegt.

Dieses Puffersystem wurde von Bjerrum und Schafner-Nielsen (1986) beschrieben. Die Transferzeit betrug 2 Stunden bei 0,8 mA/cm². Anschließend wurde die Membran in einer 4%-igen Magermilchpulverlösung während 2 Stunden unter Schütteln geblockt, danach 3x5 Minuten mit

PBS-Tween gewaschen.

Gereinigte Kaninchen anti- μ - bzw. anti- α - Ketten Antikörper (siehe Punkt 2.6.) wurden für 12 Stunden über die Nitrocellulosemembran geschichtet, worauf diese erneut 3x5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen wurde. Die zuvor gebundenen, spezifischen Antikörper konnten nun mit einem Peroxydase konjugiertem Ziegen anti-Kaninchen-IgG Antikörper (Fa. Paesel, Frankfurt) markiert werden. Dieser wurde, in einer 1:1000 Verdünnung in PBS, 1 Stunde über die Membran geschichtet. Vor der Farbreaktion wurde nochmals 3x5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen. Als Substrat für die Peroxidase wurde Chlornaphtol verwendet.

Die Molekulargewichte der so identifizierten Immunglobuline konnten entweder im Polyacrylamidgel oder auf der Nitrocellulose ermittelt werden. Die vorgefärbten Molekulargewichtsmarker zeichneten sich auf der Membran ohne zusätzliche Färbung deutlich ab.

Für das pentamere IgM und das sekretorische IgA waren die Molekulargewichte allerdings nur durch den Vergleich ihrer R_f -Werte mit denen bekannter Hühner-IgM- bzw. IgA-Probe zu ermitteln, da sie auf Grund ihrer hohen Molekulargewichte außerhalb des linearen Trennbereiches der Polyacrylamidgele lagen.

2.9. Statistische Methoden und Berechnungen

Die Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (SD) wurden zu jeder Stichprobe errechnet und in den Tabellen mit angegeben.

Mit Hilfe des U-Tests von Mann und Whitney (1947; entnommen aus Sachs, 1984) wurden die Stichproben auf Gleichheit der Mittelwerte geprüft. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als signifikant anerkannt.

Die Serumhalbwertszeiten der intravenös injizierten Immunglobuline IgM und IgA wurden nach folgender Formel berechnet:

$$T_{1/2} = \ln 2 / k$$

$$k = (\ln y_1 - \ln y_2) / (t_2 - t_1)$$

Dabei ist: y_1 die Serumimmunglobulinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ zum Zeitpunkt t_1 und y_2 die Serumimmunglobulinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ zum Zeitpunkt t_2 .

2.10 Puffer und Lösungen

2.10.1. Puffer

1. Phosphate buffered saline (PBS)

8,00 g NaCl
0,20 g KCl
1,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
0,40 g KH_2PO_4
0,20 g Na-Azid
ad 1 l Aqua bidest.

2. Tris buffered saline (TBS)

1,21 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)
8,70 g NaCl
0,20 g Na-Azid
mit 4 M HCl auf pH 7,3 titrieren
ad 1 l Aqua bidest.

3. 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0

0,96 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
16,30 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
0,20 g Na-Azid
ad 1 l Aqua bidest.

4. 0,1 M Na-Acetatpuffer pH 5,0

1,36 g Na-Acetat
29,20 g NaCl
834 ml 0,1 N Essigsäure
ad 1 l Aqua bidest.

5. Tris-Barbituratpuffer-Stammlösung pH 8,6 (für Agarosegele)

22,40 g 5,5-Diäthylbarbitursäure (Puffersubstanz)

44,30 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), reinst (Fa. Serva)

0,53 g Calcium-Lactat

0,65 g Na-Azid

ad 1 1 Aqua bidest.

Die Stammlösung wird zur Herstellung des Agarosegeles 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt. Für den Elektrophoresepuffer wird eine 1:4 Verdünnung benutzt.

6. Ringer-Lösung

8,60 g NaCl

0,30 g KCl

0,33 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

mit 1 M NaOH auf pH 7,4 titrieren

ad 1 1 Aqua bidest.

2.10.2 Lösungen für die SDS-Page

1. Acrylamid-Stammlösung

29,20 g Acrylamid, reinst (Fa. Serva)

0,80 g N,N'-Methylbisacrylamid, rein (Fa. Serva)

0,01 mg Bromphenolblau, reinst (Fa. Serva)

20 ml Glycerin, wasserfrei, reinst

ad 100 ml Aqua bidest.

2. Gelpuffer pH 8,8

18,17 g Tris

0,40 g Dodecylsulfat Na-Salz (SDS), reinst (Fa. Serva)

mit 4 M HCl auf pH 8,8 titrieren

ad 100 ml Aqua bidest.

3. Elektrophoresepuffer-Stammlösung pH 8,3

30,3 g Tris
144,0 g Glycin p.A. (Fa. Serva)
10,0 g SDS
10,0 mg Na-Azid
ad 1 l Aqua bidest.

Diese Stammlösung wird zur Elektrophorese 1:10 verdünnt, der pH-Wert muß ohne Titration stimmen.

4. Probenpuffer

10 ml Glycerin
2,30 g SDS
0,76 g Tris
0,01 g Bromphenolblau
mit 1 M HCl auf pH 6,8 titrieren
ad 100 ml Aqua bidest.

Der Reduktionspuffer enthält zusätzlich 5% 2-Mercaptoäthanol.

5. Ammoniumperoxodisulfat-Lösung

1,0 g Ammoniumperoxodisulfat
ad 10 ml Aqua bidest.

Die Lösung ist bei 4° C etwa 14 Tage haltbar.

2.10.3. Lösungen für das Immunoblotting

1. Transferpuffer pH 9.2

5,81 g Tris
2,93 g Glycin
0,37 g SDS
200 ml Methanol
ad 1 l Aqua bidest.
mit 0,1 M NaOH auf pH 9,2 einstellen

2. PBS- Tween

8,00 g NaCl
0,20 g KCL
1,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
0,40 g KH_2PO_4
0,50 ml Tween 20
ad 1 l Aqua bidest.

3. Milchpulver-Lösung

4,0 g Magermilchpulver
ad 100 ml PBS (ohne Na-Azid)

4. Substrat-Lösung

Stammlösung

150 mg 4-Chlor-1 Naphtol
50 ml Methanol

Substratlösung

5,0 ml Stammlösung
0,5 ml 0,6%-ige H_2O_2 (30% H_2O_2 1:50 verdünnt)
24,5 ml TBS (ohne Na-Azid)

2.10.4. Puffer für die Affinitätschromatographie

1. Startpuffer

5,6 g KH_2PO_4
21,0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
14,6 g NaCl
0,2 g Na-Azid
5 ml Tween 80 100%-ig
ad 1 l Aqua bidest.

2. Elutionspuffer pH 2,5

7,5 g Glycin
29,2 g NaCl
mit 1 M HCl auf pH 2,5 einstellen
ad 1 l Aqua bidest.

2.10.5. Färbelösungen

1. Coomassie-Färbelösung für Agarosegele und SDS-Page

450 ml Aqua dest.
450 ml Äthanol, technisch
100 ml Essigsäure 96%-ig, technisch
2,5 g Coomassie-Brilliant-Blau R-250 (Fa. Serva)

2. Entfärbelösung für Agarosegele

450 ml Aqua dest.
450 ml Äthanol, technisch
100 ml Essigsäure 96%-ig, technisch

3. Entfärbelösung für SDS-Page

650 ml Aqua dest.
250 ml Äthanol, technisch
100 ml Essigsäure 96%-ig, technisch

Die beiden Entfärbelösungen konnten nach Gebrauch zur Wiederverwendung aufbereitet werden, indem sie über Aktivkohle entfärbt wurden.

Wenn nicht anders angegeben, stammten die Chemikalien von der Fa. Merck, Darmstadt.

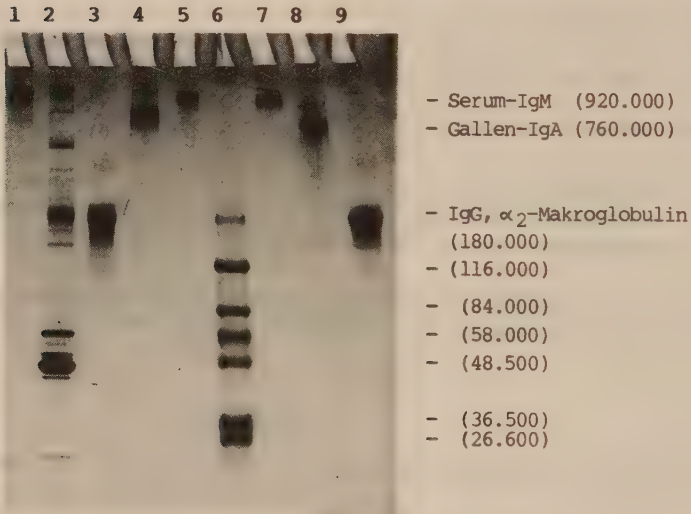
3. ERGEBNISSE

3.1. Erstellen eines Standardserums

Die aus Serum und Galle gereinigten Hühnerimmunglobuline IgM und IgA wurden nach dem Screening in der Immunelektrophorese, in der jeweils nur ein für das Protein charakteristisches Präzipitat auftrat, in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf Verunreinigungen untersucht. Aufgetragen wurden je 20 μ g der gereinigten Substanz. Wie aus Abbildung 1 zu ersehen ist, färbte sich jeweils nur eine Proteinbande an. Auch in der zusätzlich durchgeführten Rocket-Immunelektrophorese war in den Proben nur je ein Immunglobulin-Isotyp nachweisbar.

Abbildung 1

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese; Gradientengel 3-15%
(Legende siehe nächste Seite)



- 1= Injektionslösung (siehe Punkt 3.7.)
- 2= Serum dysgammaglobulinämischer Hühner (siehe Punkt 2.7.1.2.)
- 3= IgG (Fa. Sigma, siehe Punkt 2.7.1.3.)
- 4= Eiklarpräparation (siehe Punkt 3.5.)
- 5= IgM (gereinigte Substanz, siehe Punkt 3.1.)
- 6= Molekulargewichtsmarker SDS-7B (reduziert)

α_2 -Makroglobulin	(180.000)
β -Glucosidase	(116.000)
Fructose-6-Phosphat Kinase	(84.000)
Pyruvat Kinase	(58.000)
Fumarase	(48.500)
Lactat Dehydrogenase	(36.500)
Triosephosphat Isomerase	(26.600)
- 7= Dottersackpräparation (siehe Punkt 3.5.)
- 8= IgA (gereinigte Substanz; aus Galle, siehe Punkt 3.1)
- 9= IgG (Fa. Sigma, siehe Punkt 2.7.1.3.)

Die Proteinbestimmung ergab für die Immunglobulinaufreinigungen 0,185 mg IgA bzw. 1,013 mg IgM pro ml Lösung.

An diesen als Reinsubstanzen bezeichneten Lösungen konnte ein Serum-pool aus den Seren immunologisch intakter und dysgammaglobulinämischer Hühner geeicht werden.

Der im weiteren als Standard 87 bezeichnete Serumpool wurde dazu in der Rocket-Immunelektrophorese im Vergleich mit den Reinsubstanzen gemessen.

Er enthielt 1,23 mg/ml IgA und 4,96 mg/ml IgM.

3.2. Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit der Rocket-Immunelektrophorese

Eine Verdünnungsreihe des Standards 87 wurde in der Rocket-Immunelektrophorese gemessen. Als Nachweisgrenze wurde der kleinste, noch im linearen Abschnitt der Eichkurve liegende Peak bezeichnet.

Für IgM konnte so ein Wert von 0,008 mg/ml Serum ermittelt werden; für IgA ergaben sich 0,003 mg/ml. Diese Werte waren nur zu erreichen, wenn die Antiserumkonzentration in der Agarose auf 1% für die IgM- und 0,7% für die IgA-Bestimmung gesenkt wurde.

Um unter diesen Bedingungen die Elektropherogramme der Eiklar- und

Dottersackproben noch auswerten zu können, mußten die Gele zusätzlich mit Silbernitrat gefärbt werden.

In Serumproben waren die Immunglobuline IgM und IgA auch unterhalb dieser Grenzwerte noch nachweisbar, ohne aber sicher quantitativ erfaßt werden zu können. Wurden solche Präzipitate, die im allgemeinen eine Größe unter 0,8 cm aufwiesen, gefunden, so wird dies in der Arbeit durch ein <-Zeichen zum Ausdruck gebracht.

Die IgG-Nachweisgrenze in der Rocket-Immunelektrophorese lag für die von der Fa. Sigma bezogene Substanz bei 0,009 mg/ml Lösung. Konzentrationen unter 0,005 mg/ml bildeten keine sichtbaren Präzipitate im Gel.

3.3. Bestimmung der IgA-Konzentrationen im Dotter frisch gelegter Eier

18 Dotterproben von 3 immunologisch intakten Hennen wurden nach der unter Punkt 2.5.2. beschriebenen Technik präpariert und konzentriert. In 2 der 18 Proben konnte kein IgA nachgewiesen werden, alle übrigen Proben enthielten IgA-Konzentrationen von 0,003 mg/ml bis 0,015 mg/ml. Der Mittelwert aller Stichproben betrug 0,008 mg/ml, die Standardabweichung 0,006 mg/ml.

3.4. Vergleich der Immunglobulinmengen des Eiklars frisch gelegter Eier mit denen des Dottersackinhaltes 21 Tage alter Embryonen

Die Eier von vier Hennen wurden in täglichem Wechsel entweder in einen automatischen Brüter eingelegt oder innerhalb eines Tages nach der Eiablage zur Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen im Eiklar präpariert.

Am 21. Tag der Brut wurden dann die Dottersäcke der inkubierten Eier auf ihre Immunglobulinkonzentrationen untersucht. Dabei beschränkten sich die Messungen auf die Immunglobuline IgM und IgA. Das im Dottersack in hoher Konzentration vorliegende IgG war in diesem Zusammenhang nicht von Interesse.

Die Gesamtmengen beider Immunglobuline im Eiklar des frisch gelegten Eies und des Dottersackes konnte aus den gemessenen Konzentrationen und den Volumina der Kompartimente errechnet werden.

Durch diesen Versuchsaufbau war es möglich, an aufeinanderfolgenden Tagen gelegte Eier miteinander zu vergleichen. Allerdings konnte dieses Schema nicht immer konsequent eingehalten werden, da einerseits bei der Eiklarpräparation wiederholt Proben mit Dotter verunreinigt wurden, andererseits nicht jedes Ei befruchtet war, und zusätzlich einige Embryonen während der Brut abstarben.

Die Ergebnisse der Messungen sind in den Zusammenstellungen des tabellarischen Anhangs wiedergegeben (Tabellen I bis VIII). Für jede Henne werden die Immunglobulinkonzentrationen und die errechneten Immunglobulinmengen unter Angabe des Datums der Eiablage dargestellt.

Eine Übersicht der errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen geben die Abbildungen 2 und 3 und die Tabelle 3.

Abbildung 2

Vergleich der IgM-Menge im Eiklar (EK) des frisch gelegten Eies mit der des Dottersackes (DS) vom 21. Tag der Inkubation

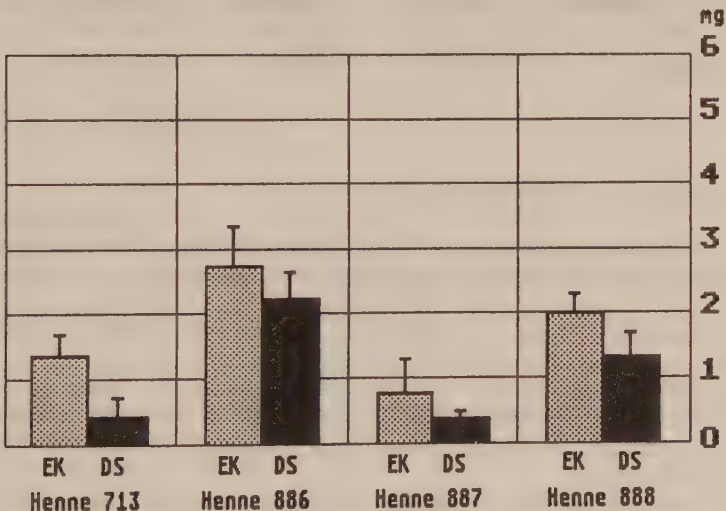
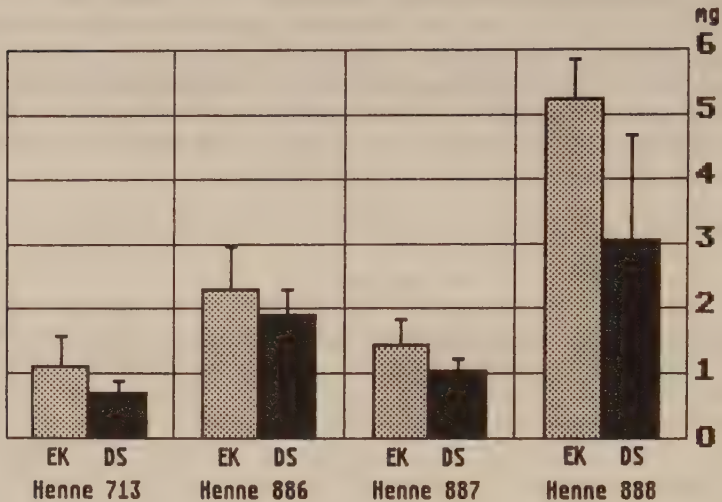


Abbildung 3

Vergleich der IgA-Mengen im Eiklar (EK) des frisch gelegten Eies mit der des Dottersackes (DS) vom 21. Tag der Inkubation



Aus diesen Daten ist zu ersehen:

1. Bei den Nachkommen jeder der 4 Hennen fanden sich im Dottersack höhere Konzentrationen der Immunglobuline IgM und IgA als im Eiklar.

2. Demgegenüber lagen die errechneten Gesamtmengen dieser Immunglobuline im Eiklar stets über denen des Dottersackes.

Um diese Aussage statistisch abzusichern, wurde der U-Test nach Mann und Whitney durchgeführt. Geprüft wurden die Eiklar- und Dottersackstichproben der jeweiligen Henne im zweiseitigen Test auf Gleichheit der Mittelwerte.

Für den Vergleich der IgM-Mengen konnte die Nullhypothese bei allen vier Gruppen auf dem 1%-Niveau abgelehnt werden. Die gleiche Aussage

konnte für den Vergleich der IgA-Mengen der Hennen 887 und 888 getroffen werden. Dagegen war der Unterschied bei den Hennen 713 und 886 erst auf dem 5%-Niveau signifikant.

Folgende Alternativhypothese wird akzeptiert: auf dem 5%-Niveau gilt für alle Stichprobenmittelwerte: die IgM- bzw. IgA-Mengen im Eiklar des frisch gelegten Eies sind größer als die IgM- bzw. IgA-Mengen im Dottersack am 21. Tag der Brut.

Die im Untersuchungszeitraum von 4 bis 8 Wochen ebenfalls gemessenen Serum-Immunglobulinkonzentrationen der Hennen schwankten im Mittel für das IgM zwischen 1,335 mg/ml und 2,145 mg/ml. Für das IgA wurden Konzentrationen von 0,258 mg/ml bis 0,447 mg/ml gemessen. Die Tabellen 4 a und b geben die einzelnen Werte der Hennen wieder.

Tabelle 4a

Serum-Immunglobulinkonzentrationen der Hennen 713, 886, 887 und 888 (an Tagen, die mit einem - bezeichnet sind, wurde keine Probe untersucht)

Serum-IgM in mg/ml der Hennen Nr.				
Datum der Blutentnahme	713	886	887	888
27.6.	0,841	-	1,796	-
15.7.	1,050	-	1,022	-
28.7.	1,556	1,609	-	-
5.8.	1,495	-	1,044	2,232
17.8.	1,733	2,301	-	1,897
20.9.	-	2,526	-	1,728
n =	5	3	3	3
$\bar{x}$ =	1,335	2,145	1,487	1,952
SD =	0,374	0,478	0,394	0,257

Tabelle 4b

Serum-Immunglobulinkonzentrationen der Hennen 713, 886, 887 und 888 (an Tagen, die mit einem - bezeichnet sind, wurde keine Probe untersucht)

Serum-IgA in mg/ml der Hennen Nr.				
Datum der Blutentnahme	713	886	887	888
27.6.	0,244	-	0,348	-
15.7.	0,324	-	0,413	-
28.7.	0,269	0,463	-	-
5.8.	0,261	-	0,364	0,387
17.8.	0,192	0,441	-	0,356
20.9.	-	0,437	-	0,583
n =	5	3	3	3
$\bar{x}$ =	0,258	0,447	0,375	0,422
SD =	0,048	0,014	0,034	0,123

Die während der Untersuchung ermittelten Eiklar- und Dottersackvolumina sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5

Mittelwerte und Standardabweichungen der Eiklar- und Dottersackvolumina

Henne Nr.	Eiklarvolumen am Tag der Eiablage (in ml)			Dottersackvolumen am 21.Tag der Brut (in ml)		
	n	$\bar{x}$	SD	n	$\bar{x}$	SD
713	11	32,8	2,5	9	8,0	1,0
886	17	31,4	3,2	16	8,1	1,1
887	11	27,0	2,6	11	8,1	1,6
888	17	35,9	2,4	14	9,9	1,4
aller Proben	56	32,4	3,8	50	8,7	1,5

3.5. Molekulargewichtsvergleich der Immunglobuline IgM und IgA im Eiklar und Dottersackinhalt

a) Untersuchung der Eiklarimmunglobuline

Das Chromatogramm der Trennungen von Eiklarpräparationen an Ultrogel AcA 22 ist in der Abbildung 4 dargestellt. Die Extinktionen des Eluates wurden kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. IgM eluierte ausschließlich in den Fraktionen 18-20 mit einer maximalen Konzentration in Fraktion 19. IgA wurde nahezu gleichzeitig in den Fraktionen 19 und 20 gefunden. Die höchste Konzentration enthielt die letztere Fraktion.

Diese Werte entsprachen einer Elution bei 46-49% des Gelbettvolumens.

Die immunglobulinhaltigen Fraktionen mehrerer Säulenläufe wurden konzentriert und anschließend in der SDS-Page getrennt und auf Nitrocellulose geblottet.

Nach der immunologischen Identifizierung zeichnete das Eiklar-IgM auf der gleichen Höhe wie das pentamere IgM der Reinsubstanz, welches nach Schraner und Lösch (1986) ein Molekulargewicht von 920.000 Dalton hat.

Aus Galle gereinigtes IgA und Eiklar-IgA legten in der SDS-Page ebenfalls die gleichen Laufstrecken zurück.

b) Untersuchung der Dottersackimmunglobuline

Ebenso wie das Eiklar, wurde präparierter Dottersackinhalt an Ultrogel AcA 22 gereinigt. Die Trennbedingungen waren mit denen des Eiklars identisch. Die höchsten Konzentrationen der Immunglobuline IgM und IgA traten ebenfalls in den Fraktionen 19 und 20 auf (Abbildung 5). Meßbare Immunglobulinkonzentrationen waren in keiner weiteren Fraktion vorhanden.

Nach der Trennung in der SDS-Page und elektrischem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran konnten die Proteinbanden wiederum spezifisch markiert werden.

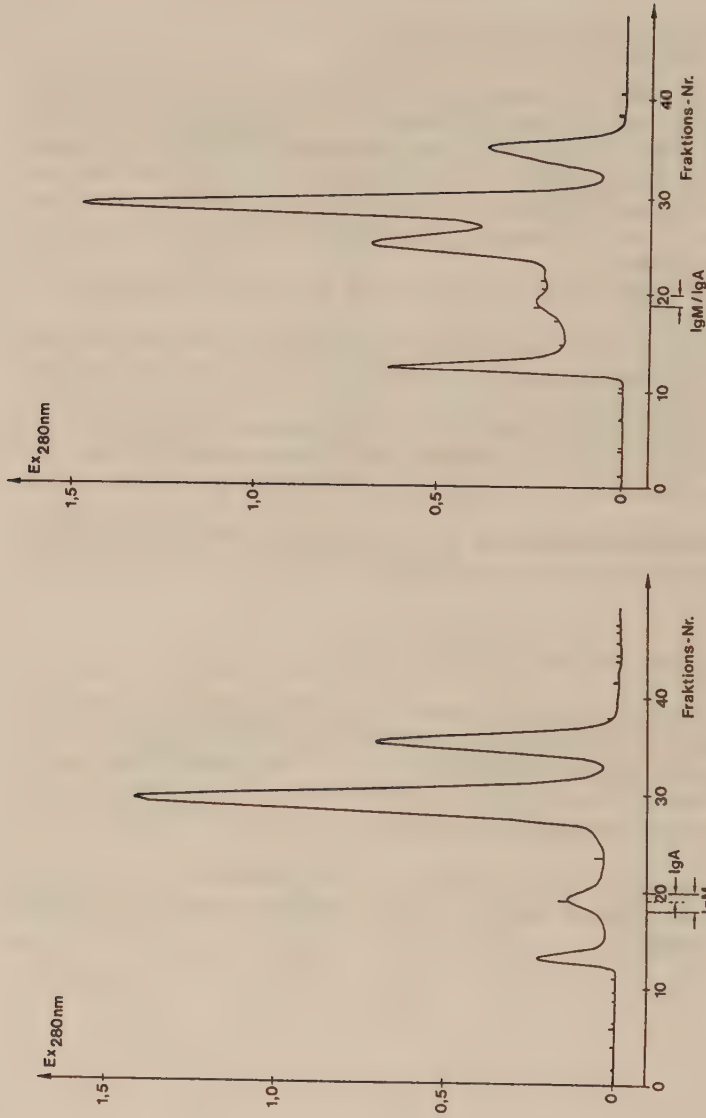


Abbildung 4

Chromatographie einer Eiklarpräparation an
Ultrogel ACA 22 in 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0

Abbildung 5

Chromatographie einer Dottersackpräparation an
Ultrogel ACA 22 in 0,1 M Phosphatpuffer pH 8,0

c) Vergleich der Molekulargewichte

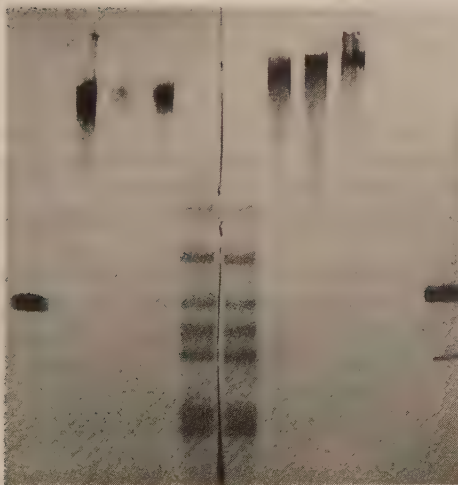
Zum besseren Vergleich der Eiklar- und Dottersackimmunglobuline untereinander und mit reinem Serum-IgM bzw. reinem Gallen-IgA wurden die angereicherten Fraktionen in der SDS-Page nebeneinander getrennt und so auf Nitrocellulose übertragen.

Abbildung 6 gibt die Ergebnisse des Immunoblottings wieder.

Abbildung 6

Immunoblotting (Trennung der Proteine in der SDS-Page;
Gradientengel 3-15%)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



1=Gallen-IgA (reduziert;
H-Kette)

2= Gallen-IgA

3= Dottersack-IgA

4= Eiklar-IgA

5= Molekulargewichtsmar-
& ker SDS-7B (siehe
6= Abbildung 1)

7= Eiklar-IgM

8= Dottersack-IgM

9= Serum-IgM

10= Serum-IgM (reduziert;
H-Kette)

Die von den Immunglobulinen IgM zurückgelegten Laufstrecken im Polyacrylamidgel waren, wie zu erkennen ist, für die Isolate aus Eiklar, Dottersackinhalt und Serum stets gleich. Das IgM liegt demnach in allen drei Kompartimenten als Pentamer vor. Es hat ein Molekulargewicht von 920.000 Dalton.

Auch die IgA-Banden der Präparationen aus Eiklar, Dottersack und Gallenflüssigkeit traten im Gel auf der gleichen Höhe auf. Das Molekulargewicht des Immunglobulins IgA aus der Gallenflüssigkeit wird mit 760.000 Dalton angegeben und ist höher als das des dimeren Serumimmunglobulins IgA, da es als tetramer vorliegt und zusätzlich ein, als sekretorische Komponente bezeichnetes Protein enthält. Die Molekulargewichte der Eiklar- und Dottersackimmunglobuline IgA deuten darauf hin, daß auch sie eine sekretorische Komponente enthalten.

3.6. Ergebnis der chemischen Bursektomie

3.6.1. Aufzucht der Tiere

Von 120 eingelegten Eiern waren 98 Eier am 18. Tag der Brut normal entwickelt. In der mit 2% Testosteronpropionat behandelten Gruppe waren 9 Embryonen abgestorben, in der mit 1% TP behandelten 7 Embryonen und in der unbehandelten Gruppe 3. Drei Eier waren unbefruchtet.

Nach dem Schieren erfolgte der Transfer von 40 Eiern in die Keimfreieinheiten, wie unter Punkt 2.3 beschrieben. Die Tabellen 6 und 7 zeigen die Entwicklung des Tierbestandes während der Haltung in den Isolatoren bis zum Tag der Konventionalisierung.

Tabelle 6

Tierbestand des Isolators I bis zum 90. Tag

Gruppe Nr.	I	III	IV
Behandlung: % TP	2%	k.B.*	k.B.
ml CP	3x0,3	4x0,3	k.B.
Anzahl der eingeschleusten Eier	10	5	5
Anzahl der geschlüpften Tiere	5	5	4
Anzahl der im Isolator gestorbenen Tiere	2	-	-
Am 60. Lebenstag wurden ausgeschleust (Tiernummer und Geschlecht)	101 m.	105 w. 106 w. 107 w.	109 m. 102 m. 103 w.
Am 90. Lebenstag wurden ausgeschleust (Tiernummer und Geschlecht)	290 w. 291 w.	292 w. 293 w.	294 m.

Tabelle 7

Tierbestand des Isolators II bis zum 90. Tag

Gruppe Nr.	I	III	IV
Behandlung: % TP	1%	k.B.*	k.B.
ml CP	3x0,3	4x0,3	k.B.
Anzahl der eingeschleusten Eier	10	5	5
Anzahl der geschlüpften Tiere	6	2	3
Anzahl der im Isolator gestorbenen Tiere	3	-	-
Am 60. Lebenstag wurden ausgeschleust (Tiernummer und Geschlecht)	-	-	5 w. 6 w. 7 w.
Am 90. Lebenstag wurden ausgeschleust (Tiernummer und Geschlecht)	295 w. 296 w. 298 m.	297 w. 299 m.	

* k.B.: keine Behandlung

Aus den am 18. Tag der Inkubation im Brutschrank verbliebenen 58 Eiern schlüpften 30 Küken, die in einem separaten Stall aufgezogen wurden. Seinen Tierbestand und dessen Entwicklung zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8

Tierbestand im Stall bis zum 90. Tag

Gruppe Nr.	I	II	III	IV
Behandlung: % TP	2%	1%	k.B.*	k.B.
ml CP	3x0,3	3x0,3	4x0,3	k.B.
Anzahl der am 18.Tag der Inkubation im Brutschrank verbliebenen Eier	20	25	9	4
Anzahl der bis zum Schlupf gestorbenen Embryonen	13	11	3	1
Anzahl der geschlüpften Küken	7	14	6	3
Anzahl der bis zum 30. Tag gestorbenen Tiere	6	7	4	-
Anzahl der zwischen dem 30. und 90. Tag gestorbenen Tiere	-	1	-	-
Bestand am 90. Tag	162 w.	159 w.	166 w.	168 m.
(Tiernummer und Geschlecht)		151 m.	167 w.	169 m.
		152 m.		170 m.
		153 m.		
		155 m.		
		157 m.		

* k.B.: keine Behandlung

Nach der Konventionalisierung (siehe Punkt 2.3.) der in den Isolatoren aufgezogenen Tiere wurden alle Hühner gemeinsam im Stall gehalten. Die weitere Entwicklung dieses Bestandes zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9

Entwicklung des Tierbestandes im Stall nach dem 90. Tag

Gruppe Nr.	I	II	III	IV
Behandlung: % TP	2%	1%	k.B.*	k.B.
ml CP	3x0,3	3x0,3	4x0,3	k.B.
Bestand am 90. Lebenstag	4	9	9	10
davon männlich	1	6	1	6
weiblich	3	3	8	4
Bestand nach 6 Monaten				
männliche Tiere	0	0	0	6
weibliche Tiere	2	1	5	4
Anzahl der legenden Hennen	1	1	4	4
im Versuch				
Tiernummer/ aufgewachsen				
im Isolator I	290		292	
Isolator II			297	
Stall		159	166	
			167	

Nicht in die Tabelle 9 mit aufgenommen ist ein weiteres Tier, das lediglich drei Eier in mehrwöchigem Abstand legte und nach jeder Eiablage schwer erkrankte. Die 8 männlichen Tiere der behandelten Gruppen wurden am 90. Tag aus dem Versuch genommen.

Zu jeder bursektomierten Henne wurde ein Hahn der Kontrollgruppe gesetzt, wobei einige dieser Hähne regelmäßig auch zu den Hennen der Kontrollgruppe gewechselt wurden. Die Fertilität der Hähne war gut, wie aus den Befruchtungsergebnissen in der Kontrollgruppe zu ersehen war.

Die Zahl der befruchteten Eier in der Gruppe der bursektomierten Tiere blieb gering, obwohl die Hennen regelmäßig Eier legten.

Die ersten Tiere begannen im Alter von 7 Monaten zu legen, die letzten mit 9 Monaten. Tabelle 10 zeigt die Legeleistung und die Zahl der befruchteten Eier.

Tabelle 10

Legeleistung und Befruchtungsergebnis der bursektomierten Hennen

Henne Nr.	159	166	167	290	292	297
aus der Gruppe Nr.	II	III	III	I	III	III
Anzahl der gelegten Eier	24	16	119	77	68	84
Anzahl der befruchteten Eier	14	-	3	12	13	19
Dauer der Legeperiode in Tagen	16	19	148	115	73	125

Tiere, die starben, wurden am Institut für Geflügelkrankheiten der Universität München untersucht.

Die pathologisch-anatomischen Untersuchungen ergaben stets die Befunde Hepathopathie, Nephropathie und Polyserositis fibrinosa. Gewebe der Bursa Fabricii war nicht mehr zu finden, der Thymus war dagegen regelmäßig ungewöhnlich deutlich entwickelt. Hochgradige Keimzahlen an *E. coli* wurden bei der bakteriologischen Untersuchung gefunden.

Im beschriebenen Versuch gelang es aus 90 behandelten Eiern insgesamt sechs legende Hennen aufzuziehen.

3.6.2. Immunglobulinnachweis im Serum der bursektomierten Hennen

Am Tag der Konventionalisierung wurde den Tieren die erste Blutprobe abgenommen. Die zweite Entnahme erfolgte nach 6 Monaten und von diesem Zeitpunkt an regelmäßig alle 14 Tage eine weitere Entnahme.

Die Hennen 159, 166, 290 und 292 hatten keine meßbaren Serumimmunglobulinwerte im Untersuchungszeitraum.

Die Henne 297 bildete Serum-IgM in Konzentrationen zwischen $< 0,008$ mg/ml und $0,016$ mg/ml. 5 von 10 Proben dieses Tieres enthielten keine meßbaren IgM-Werte. Andere Immunglobuline waren nicht nachweisbar.

Die Henne 167 zeigte zunächst Serum-IgM-Werte, die zwischen $0,009$ mg/ml und $0,028$ mg/ml schwankten, wobei auch hier 6 von 10 Proben ohne meßbare IgM-Konzentrationen gefunden wurden. Zum Versuchsende wurde

eine Serumprobe mit 0,048 mg/ml IgG gemessen. Da diese gelegentlich gemessenen Serumimmunglobulinwerte extrem niedrig lagen, wurden beide Tiere mit in die weiteren Untersuchungen einbezogen und im Folgenden ebenfalls als agammaglobulinämisch bezeichnet.

3.6.3. Ergebnisse der Untersuchungen an Eiern, Embryonen und Nachkommen der agammaglobulinämischen Hennen

3.6.3.1. Untersuchung frisch gelegter Eier

Die Immunglobulinkonzentrationen der Eier dieser agammaglobulinämischen Hennen wurden im Versuchszeitraum regelmäßig untersucht, um eine während dieser Zeit eintretende Antikörpersekretion der Tiere erfassen zu können. Die Zahl der untersuchten Eier schwankte, durch die unterschiedliche Legeleistung bedingt, von Henne zu Henne. Es wurden für die

Hennen	159	166	167	290	292	297
	10	5	22	17	12	23

Eier ausgewertet.

In keinem Ei konnten Immunglobuline gemessen werden, mit Ausnahme der Eier der Henne 167. Diese enthielten zum Ende der Versuchsperiode IgG-Antikörper im Dotter, nachdem auch im Serum IgG gemessen worden war (siehe Seite 46/47). Der Mittelwert von sechs untersuchten Eiern betrug 0,075 mg/ml Dotter, die Standardabweichung 0,013 mg/ml. Im Eiklar dieser Eier wurden keine Immunglobuline nachgewiesen, obwohl zeitweise auch Serum-IgM gemessen wurde (siehe Seite 46).

3.6.3.2. Untersuchung der extraembryonalen Kompartimente des 16 Tage bebrüteten Eies

Dottersackinhalt, Amnion- und Allantoisflüssigkeit von 16 Tage alten Embryonen wurden auf Immunglobuline untersucht.

Die Eier stammten von den Hennen 290, 292 und 297. Von jeweils 6 Embryonen wurden die Proben wie beschrieben entnommen und in der Rocket-Immunoelektrophorese entwickelt.

Keine der Proben wies meßbare Immunglobulinkonzentrationen auf.

3.6.3.3. Untersuchung des Dottersackinhaltes 21 Tage alter Embryonen

Die Dottersäcke von 8 Nachkommen der Henne 159, von 6 Nachkommen der Henne 290 und 3 bzw. 8 Nachkommen der Hennen 292 und 297 wurden zur Immunglobulinbestimmung präpariert.

Die Proben enthielten keine meßbaren Immunglobulinmengen.

Da der Dottersackinhalt präparationsbedingt mit PBS verdünnt worden war, wurden die Proben aller Nachkommen einer Henne nach der Messung vereinigt und durch Ammoniumsulfatfällung auf ein Drittel des Dottervolumens konzentriert. Auch bei der Messung dieses angereicherten Untersuchungsmaterials konnten keine Immunglobuline erfaßt werden.

3.6.3.4. Untersuchung der Immunglobulinkonzentrationen im Serum der Nachkommen agammaglobulinämischer und immunologisch intakter Hennen

Von 10 männlichen und 5 weiblichen Nachkommen der agammaglobulinämischen Hennen wurde am Tag des Schlupfes die erste Blutprobe gewonnen. Für die folgenden Entnahmen wurden die Tiere in zwei Gruppen geteilt. Den 4 männlichen und 3 weiblichen Tieren der Gruppe A wurde das Blut an den geradzahligen Lebenstagen entnommen, den 6 männlichen und 2 weiblichen Tieren der Gruppe B an den ungeradzahligen Lebenstagen.

Die Serum-Immunglobulinkonzentrationen der einzelnen Tiere und die sich daraus errechnenden Mittelwerte für die Gruppen A und B, die ohne Berücksichtigung der Geschlechter bestimmt wurden, sind in den Tabellen IX bis XIV aufgelistet (zusammengestellt im tabellarischen Anhang).

Zeitlich parallel zu diesem Versuch wurde einer Kontrollgruppe von 7 Küken unbehandelter Hennen Blut entnommen. Die Probengewinnung erfolgte wie bei den Tieren der Gruppe A an den geradzahligen Lebenstagen. In der 4. Lebenswoche wurde, von diesem Schema abweichend, nur noch am 24., 27. und 30. Tag nach dem Schlupf eine Probe gewonnen. Die ermittelten Immunglobulinkonzentrationen und die errechneten Mittelwerte dieser Kontrollgruppe sind den Tabellen XV bis XVII im tabellarischen Anhang zu entnehmen.

Gemessen wurden die drei für das Huhn beschriebenen Immunglobuline IgG, IgM und IgA.

a) Serum-IgG-Werte während des ersten Lebensmonats

Am Tag des Schlupfes wies keines der Tiere Serum-IgG auf und auch 24 Stunden später konnte bei den Tieren der Gruppe B dieses Immunglobulin noch nicht erfaßt werden.

Erst ab dem zweiten Lebenstag wurde IgG nachgewiesen. Mit Ausnahme des Kükens Nr. 122 begann bei allen Tieren die Serum-IgG-Synthese bis zum Ende der ersten Lebenswoche.

Die IgG-Konzentrationen stiegen im Untersuchungszeitraum bei den einzelnen Tieren unterschiedlich schnell und schwankten am 28. bzw. 29. Tag nach dem Schlupf zwischen 0,127 mg/ml und 1,213 mg/ml, also etwa um den Faktor 10. Dabei wurden sowohl in der Gruppe der männlichen als auch in der der weiblichen Tiere derart hohe und niedrige Werte gemessen.

Auch die errechneten Mittelwerte zeigen keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern auf.

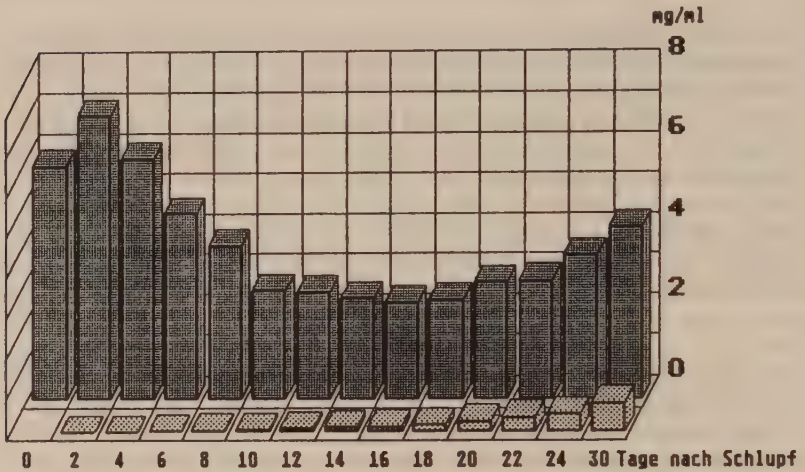
In der Kontrollgruppe wurden bereits am Tag des Schlupfes Werte gefunden, die im Mittel bei 5,807 mg/ml lagen und die bis zum zweiten Lebenstag auf durchschnittlich 7,040 mg/ml anstiegen. Danach fiel der Serum-IgG-Wert bei den 7 Tieren der Gruppe schnell ab und erreichte mit einem Mittelwert von 2,408 mg/ml am 16. Tag seinen tiefsten Stand. Bis zum Ende des Versuchszeitraumes am 30. Tag nahm dann die IgG-Konzentration wieder auf einen um 1,854 mg/ml höher liegenden Mittelwert zu.

Zwischen den einzelnen Tieren waren dabei sehr starke Unterschiede vorhanden, wobei das Tier Nr. 141 mit 0,205 mg IgG pro ml Serum am Tag des Schlupfes den mit Abstand niedrigsten Wert aufwies. Dennoch zeigte sich auch bei diesem Küken ein Gipfel der IgG-Konzentration am 2. Lebenstag und eine weitere Entwicklung der Werte wie bei den übrigen Tieren, allerdings auf einem niedrigeren Niveau.

In Abbildung 7 sind diese Entwicklungen graphisch dargestellt.

Abbildung 7

Graphische Darstellung der Immunglobulin IgG Konzentrationen im Küken-
serum während des ersten Lebensmonats



- hintere Reihe (dunkle Balken)= Kontrollgruppe
- vordere Reihe (helle Balken)= Nachkommen der agammaglobulinämischen Hennen (Gruppe A)

b) Serum-IgM-Werte während des ersten Lebensmonats

Bei allen Nachkommen der agammaglobulinämischen Hennen konnte IgM erstmals zwischen dem 2. und 4. Lebenstag gemessen werden. Auch dieses Immunglobulin war am Tag des Schlupfes noch nicht nachweisbar. Die Serumkonzentrationen nahmen bis zum 28. bzw 29. Lebenstag deutlich zu, zeigten aber wie beim IgG große individuelle Unterschiede. Das Tier mit den höchsten Werten hatte zu diesem Zeitpunkt 1,026 mg IgM pro ml Serum gebildet. Mit 0,249 mg/ml lag der niedrigste, gemessene Wert nur etwa 1/4 so hoch. Für die Gruppe A ergab sich am 28. Tag ein Mittelwert von 0,519 mg/ml und in der Gruppe B ein solcher von 0,615 mg/ml am 29. Tag.

Geschlechtsspezifische Unterschiede waren nicht zu erkennen; die er-

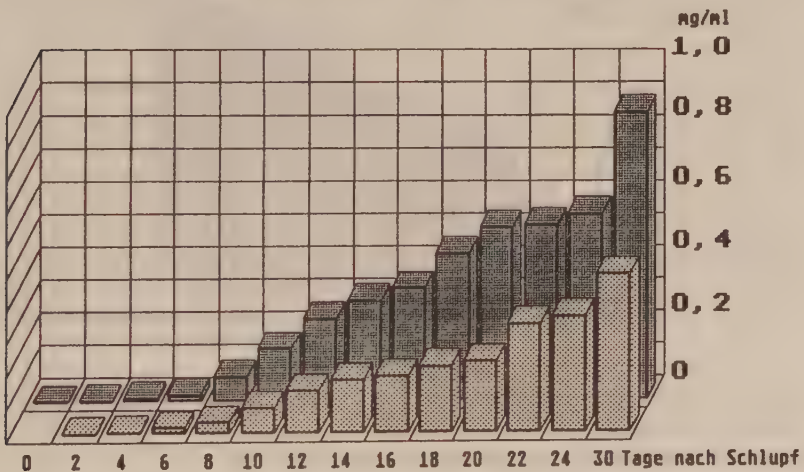
rechneten Mittelwerte für die männlichen und weiblichen Tiere waren fast identisch.

Bei zwei Kontrolltieren waren sehr niedrige Serum-IgM-Werte ($<0,008$ mg/ml) bereits am Tag des Schlupfes nachweisbar; bis zum 6. Lebenstag bildeten alle Tiere Serum-IgM. Zum Versuchsende am 30. Tag ergab sich eine mittlere Konzentration von 0,883 mg/ml Serum.

Die Abbildung 8 verdeutlicht diese Beobachtungen. Der erkennbare Unterschied in der Entwicklung der Serum-IgM-Konzentrationen zwischen der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe A wurde im U-Test geprüft. Auf dem 5%-Niveau konnte ab dem 8. Lebenstag ein Unterschied der Stichprobenmittelwerte gesichert werden. Lediglich an den Tagen 14 und 22 war der Unterschied erst auf dem 10%-Niveau signifikant.

Abbildung 8

Graphische Darstellung der Immunglobulin IgM Konzentrationen im Küken-serum während des ersten Lebensmonats



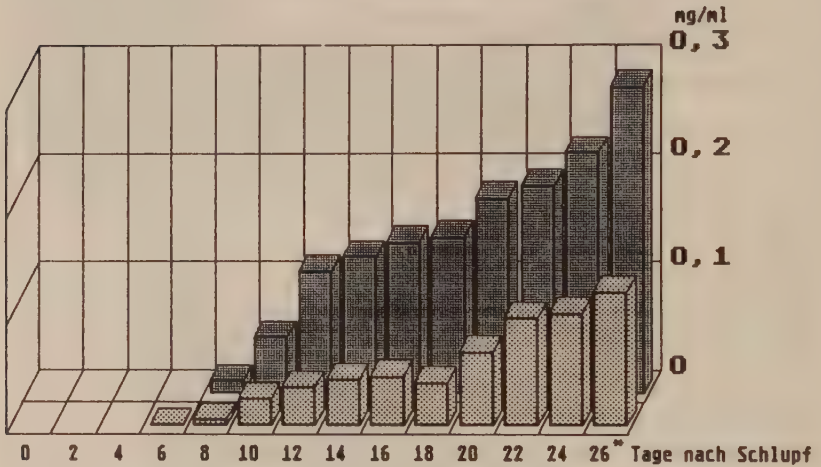
- hintere Reihe (dunkle Balken)= Kontrollgruppe
- vordere Reihe (helle Balken)= Nachkommen der agammaglobulinämischen Hennen (Gruppe A)

c) Serum-IgA-Werte während des ersten Lebensmonats

Wesentlich später als IgG und IgM war IgA im Serum zu messen. Der früheste Nachweis gelang bei zwei Küken der agammaglobulinämischen Hennen am 6. Lebenstag, während zwei weitere Tiere erst ab dem 12. bzw. 13. Lebenstag Serum-IgA aufwiesen. Die übrigen 11 Tiere begannen zwischen diesen Zeitpunkten mit der Immunglobulin-A Synthese.

Abbildung 9

Graphische Darstellung der Immunglobulin IgA Konzentrationen im Küken-serum während des ersten Lebensmonats



- hintere Reihe (dunkle Balken)= Kontrollgruppe
- vordere Reihe (helle Balken)= Nachkommen der agammaglobulinämischen Hennen (Gruppe A)

* Daten eines späteren Zeitpunktes lagen nicht vor

Am 28. bzw. 29. Tag wurden Konzentrationen von 0,091 mg/ml bis 0,409 mg/ml bestimmt. Der Mittelwert der Gruppe A betrug 0,122 mg/ml, der der Gruppe B 0,158 mg/ml. Auch hier waren die individuellen Differenzen deutlich.

Das Küken Nr. 136 fiel dadurch auf, daß es bis zum 12. Lebenstag

zunehmend Serum-IgA bildete, von da an aber immer weniger IgA aufwies, bis schließlich am 26. Lebenstag die Serumkonzentration unter der Nachweisgrenze lag.

Männlich und weibliche Küken zeigten keine Unterschiede in den IgA-Konzentrationen.

Auch in der Kontrollgruppe wurde IgA erst vom 6. Lebenstag an aufgefunden. Am 30. Tag wurde ein Mittelwert von 0,323 mg/ml errechnet. Er lag also 2 bis 2,5 mal höher als bei den Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen.

Die Graphik in Abbildung 9 verdeutlicht den Unterschied.

Diese Beobachtung konnte im U-Test auf dem 5%-Niveau statistisch gesichert werden. Ab dem 12. Lebenstag lagen die Stichprobenmittelwerte der Kontrolltiere über denen der Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen.

3.7. Ergebnisse der intravenösen Injektion der Immunglobuline IgM und IgA in agammaglobulinämische Hennen

Um zu prüfen, ob maternale Immunglobuline aus dem Blut in das Eiklar abgegeben werden und wie diese dann gegebenenfalls im wachsenden Embryo verteilt werden, erhielten zwei agammaglobulinämische Hennen eine Immunglobulinlösung intravenös verabreicht.

Die IgM- und IgA-haltigen Fraktionen der Gelfiltrationen von Serum an Ultrogel AcA 22 konnten in einer Magnetührzelle stark konzentriert werden, ohne daß Proteine ausfielen. Auch nach der anschließenden Dialyse blieben die Immunglobuline gelöst. Die SDS-Page (siehe Abbildung 1) zeigt die Injektionslösung im Vergleich mit dem Serum. Der Grad der Aufreinigung und Anreicherung wird sichtbar.

Die folgende Tabelle 11 gibt die Immunglobulinkonzentrationen der beiden Lösungen vor und nach der Sterilfiltration wieder.

Tabelle 11

Immunglobulinkonzentrationen der Injektionslösungen vor und nach der Sterilfiltration

Immunglobulin injiziert in Henne Nr.	Lösung 1		Lösung 2	
	290		167	
	vor Sterilfiltration	nach	vor Sterilfiltration	nach
IgG mg/ml	0,24	0,23	0,30	0,21
IgM mg/ml	12,02	11,87	15,38	14,46
IgA mg/ml	1,65	1,47	1,63	1,35

Das zu injizierende Volumen wurde nach folgender Überlegung aus bekannten Daten geschätzt.

Mehner und Hartfield (1983) geben ein durchschnittliches Plasmavolumen von 4,6% des Körpergewichtes für ausgewachsene Tiere an. Angaben über das Serumvolumen waren nicht zu erhalten, so daß für die Schätzung der minimale Fehler, der sich aus der Volumendifferenz von Plasma und Serum ergibt, in Kauf genommen wurde.

Die beiden agammaglobulinämischen Hennen wogen 1157 g (Henne 167) und 1282 g (Henne 290). Diesem Gewicht entspräche demnach ein Plasmavolumen von rund 55 ml.

Die Angaben über die Serum-IgM-Konzentrationen schwanken, je nach Literatur (siehe Tabelle 2) im Bereich von 2 mg/ml Serum. Daher müßten die Tiere etwa 110 mg IgM erhalten, um einen physiologischen Serum-IgM-Wert zu erreichen. Bei einer Konzentration von 12-15 mg/ml Injektionslösung ergibt sich ein Injektionsvolumen von 8,5 ml.

Die intravenöse Gabe eines solchen Volumens ist gut verträglich, wie in einem Vorversuch ermittelt wurde.

Die Tabellen 12 und 13 geben die im Verlaufe des Versuches gemessenen Immunglobulinkonzentrationen im Serum der beiden Hennen wieder.

Ein - Zeichen gibt an, daß kein Immunglobulin nachweisbar war.

Tabelle 12

Immunglobulinkonzentrationen in mg/ml Serum der Henne 167

Zeitpunkt der Probenentnahme	Immunglobulin		
	IgG	IgM	IgA
vor der Injektion	-	-	-
nach der Injektion			
1 Minute	0,065	1,161	0,070
8 Stunden	0,034	0,903	0,074
24 Stunden	-	0,703	0,044
2 Tage	-	0,469	0,031
3	-	0,419	0,024
4	-	0,197	0,024
5	-	0,074	0,023
6	-	0,056	0,019
7	-	0,047	0,011
8	-	0,042	0,005
10	-	0,025	0,003
12	-	0,025	<0,003
14	-	-	-

Tabelle 13

Immunglobulinkonzentrationen in mg/ml Serum der Henne 290

Zeitpunkt der Probenentnahme	Immunglobulin		
	IgG	IgM	IgA
vor der Injektion	-	-	-
nach der Injektion			
1 Minute	0,023	1,621	0,198
24 Stunden	-	1,057	0,075
2 Tage	-	0,671	0,055
3	-	0,439	0,042
4	-	0,291	0,024
5	-	0,194	0,023
7	-	0,096	0,009
9	-	0,059	-
11	-	-	-

Eier der Hennen 167 und 290 wurden an 3 Tagen vor Versuchsbeginn gesammelt und untersucht. Sie enthielten keine meßbaren Immunglobulinkonzentrationen.

Während des Versuches legte die Henne 167 am 1., 3., 6., 7. und 9. Tag nach der Injektion Eier. Die Henne 290 legte am 1., 3., 4., 6., 7. und 11. Tag je ein Ei.

In den Dotter- und Eiklarpräparationen dieser Eier waren keine Immunglobuline nachzuweisen.

Aus den Daten der Tabellen 12 und 13 wurden die Eliminationskurven der Immunglobuline IgM und IgA erstellt.

Der dekadische Logarithmus der Immunglobulinkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ wurde gegen den Zeitpunkt der Probenentnahme aufgetragen. Die Regressionsgerade wurde errechnet und nach den Werten der Geradengleichungen in die Graphiken 1 und 2 eingezeichnet.

Die sich aus den Angaben errechnenden Halbwertszeiten der Immunglobuline zeigt die folgende Aufstellung.

Tabelle 14

Serumhalbwertszeiten der Hühnerimmunglobuline IgM und IgA

Immunglobulin	Henne Nr.	Halbwertszeit (in Tagen)
IgM	167	1,4
	290	1,8
IgA	167	3,3
	290	1,9

Abbildung 10

Serumeliminationskurven des Immunglobulins IgM nach intravenöser Injektion in agammaglobulinämische Hennen

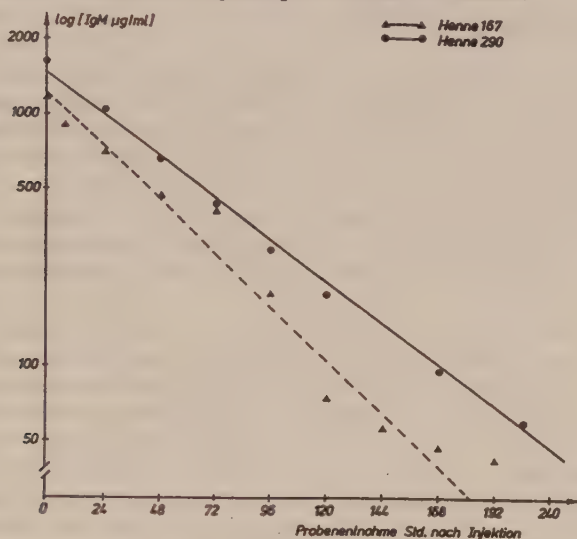
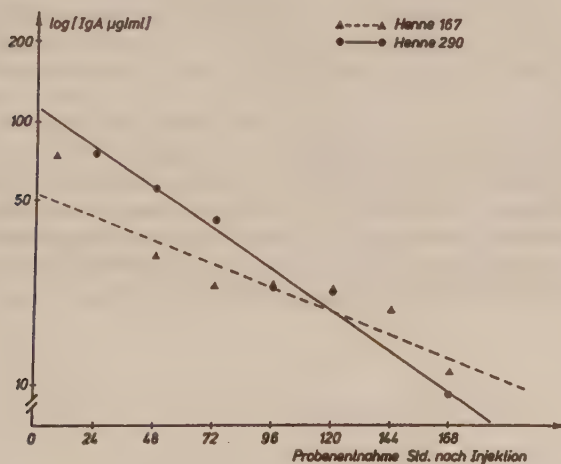


Abbildung 11

Serumeliminationskurven des Immunglobulins IgA nach intravenöser Injektion in agammaglobulinämische Hennen



4. DISKUSSION

4.1. Besprechung der Meßmethode

Grundlage für den Nachweis und die quantitative Bestimmung der Immunglobulin-Isotypen IgG, IgM und IgA im Serum und Ei des Haushuhnes und in verschiedenen Kompartimenten des Hühnerembryos war eine Meßmethode, die mehrere Kriterien gleichermaßen erfüllt. Dazu zählen eine gute Reproduzierbarkeit, eine ausreichende Nachweisempfindlichkeit und eine hohe Unempfindlichkeit gegenüber anderen als den zu messenden Substanzen. Der Diskussion der Ergebnisse soll daher eine Besprechung der gewählten Technik der Rocket-Immunelektrophorese vorausgeschickt werden.

Week (1973) beschreibt die Rocket-IE als eine einfache, schnelle und reproduzierbare Methode zur Bestimmung eines einzelnen Proteins in einem Proteingemisch. Meßfehler liegen nach seinen Angaben im Bereich von 0,4-2%. Für die Empfindlichkeit der Methode nennt er einen unteren Grenzwert von $0,3 \mu\text{g}$ Protein (Antigen) pro ml Lösung. Dieser Wert ist für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen sicher nicht allgemeingültig. Andere Autoren geben Nachweisgrenzen von $0,1 \mu\text{g/ml}$ (Andrews, 1986) bis $20 \mu\text{g/ml}$ (Roitt, 1985) an. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte verdeutlichen ebenfalls die Abhängigkeit der Nachweisempfindlichkeit von den Eigenschaften der Proteine.

Während Konzentrationen von $3 \mu\text{g}$ IgA pro ml Lösung sicher quantitativ erfaßt werden konnten, lag der Wert für das IgM bereits bei $8 \mu\text{g/ml}$ und für IgG bei $9 \mu\text{g/ml}$.

Durch eine Verringerung der Antiserumkonzentration im Agarosegel konnten noch geringere Immunglobulinkonzentrationen erfaßt werden, zumal Präzipitate, die in der Coomassie-Färbung nur schwach oder gar nicht dargestellt werden können, nach Färbung mit Silbernitrat deutlich hervortreten.

Allerdings verschlechtert sich dann, wie eigene Vorversuche ergaben, die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, insbesondere bei dem Nachweis von Immunglobulinen im Eiklar, Dotter und Dottersackinhalt. Um eine Vielzahl von Proben miteinander vergleichen zu können, ist aber gerade eine hohe Reproduzierbarkeit zu fordern und daher, zugunsten dieses Kriteriums, eine geringere Erfassbarkeitsgrenze in Kauf zu nehmen.

Die bisher veröffentlichten Konzentrationen der Hühnerimmunglobuline

in Serum, Sekret, Ei und Embryo (siehe Tabelle 2) liegen zudem deutlich über den Werten, die in dieser Arbeit mit Hilfe der Rocket-Immunelektrophorese noch quantitativ erfassbar waren.

Die untersuchten Lösungen stellten ausnahmslos komplexe Proteingemische dar. Bei der Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen mußte daher sichergestellt werden, daß die Meßergebnisse von der Vielzahl der Proteine unbeeinflußt blieben und unspezifische Reaktionen ausgeschlossen werden konnten. Da in der Rocket-Immunelektrophorese nur das zu bestimmende Antigen im Gel präzipitiert, alle übrigen Proteine aber entweder aus dem Gel auswandern oder lediglich einen diffus gefärbten Hintergrund verursachen, ist diese Technik, wie oben zitiert, eine gute Methode zur Bestimmung eines einzelnen Proteins in einem Proteingemisch.

Neuere Techniken, wie der Radioimmunoassay (RIA) oder der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) können sehr empfindlich, spezifisch (Johnstone und Thorpe, 1987) und somit bezüglich der Nachweisgrenze der Rocket-Immunelektrophorese überlegen sein.

Der RIA ist allerdings ein vergleichsweise aufwendiges Verfahren, welches ein entsprechend eingerichtetes Isotopenlabor voraussetzt.

Eigene Vorversuche mit der ELISA-Technik zeigten insbesondere ein Problem auf. Eiklar- und Dotterpräparationen führten zu starken unspezifischen Reaktionen, die nur unter großem Aufwand zu vermeiden waren. Die bei der Untersuchung von Serumproben zweifellos vorhandene hohe Empfindlichkeit ging dadurch weitgehend verloren.

Die Rocket-Immunelektrophorese kann als eine vergleichsweise sichere, gut durchführbare und zur Beantwortung der gestellten Fragen ausreichend genaue Technik angesehen werden.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Die Ontogenese des aviären B-Zell-Systems und der damit eng verbundenen Immunglobulinsynthese ist, ebenso wie die der Säugetiere und Amphibien, Gegenstand intensiver Forschung.

Während eine Serumimmunglobulinsynthese bei den Haussäugetieren und dem Menschen bereits während der Embryonalentwicklung nachgewiesen wurde, sind beim Haushuhn erst einige Tage nach dem Schlupf selbst synthetisierte Immunglobuline im Serum zu finden (Martin und Leslie, 1973a; Leslie, 1975).

Die von der Henne in das Ei abgegebenen, maternalen Antikörper und

deren Verteilung in den verschiedenen Kompartimenten des wachsenden Embryos (siehe dazu Tabelle 1, Seite 5), komplizieren die Bestimmung des Zeitpunktes, zu dem eine Immunglobulinsynthese beim Haushuhn beginnt (Rose und Orlans, 1981). Einleitend wurden diese Vorgänge, soweit bekannt und die sich daraus ergebenden Probleme bereits dargestellt.

Lösch und Schumacher diskutierten 1971 eine embryonale Immunglobulinsynthese und versuchten so, die von ihnen nachgewiesenen, deutlichen IgM-Konzentrationen im Dottersack des Eintagküchens zu erklären.

Rammensee (1984) verglich den Immunglobulingehalt des frisch gelegten Eies mit dem des bebrüteten Eies und des Eintagküchens und postulierte eine Zunahme der IgM-Gesamtmenge. Nach seiner Aussage blieb die IgA-Gesamtmenge konstant. Eine weitergehende Auswertung seiner Befunde war auf Grund des geringen Stichprobenumfanges nicht möglich.

4.2.1. Quantitative Bestimmung des Immunglobulins IgA im Eidotter frisch gelegter Eier

Neben den hohen IgG-Konzentrationen im Dotter des frisch gelegten Hühnereies (siehe Tabelle 2), wurden auch Spuren des Immunglobulins IgA nachgewiesen (Orlans und Rose, 1972; Yamamoto et al., 1975). Bei Untersuchungen an dysgammaglobulinämischen Hennen der UM-B19 Linie konnte Rammensee (1984) sogar IgA-Konzentrationen bis zu 0,1 mg/ml Dotter messen.

IgM tritt dagegen nach übereinstimmender Meinung im Dotter nicht auf (Rose und Orlans, 1981).

Es schien auf Grund dieser Befunde notwendig zu sein, den weiteren Untersuchungen eine Bestimmung der Dotter-IgA-Konzentrationen voranzuschicken, da für immunologisch intakte Hühner bisher keine quantitativen Angaben existieren.

Dabei konnte in 16 von 18 Dotterproben IgA nachgewiesen werden. Die Konzentrationen lagen häufig an der Grenze des noch quantitativ Erfassbaren. Für alle Stichproben ergab sich ein Mittelwert von 0,008 mg/ml. Legt man den weiteren Überlegungen ein Dottervolumen von 15 ml zu Grunde, so errechnet sich eine durchschnittliche Gesamtmenge von 0,12 mg. Dieser Betrag entspricht etwa 4% der IgA-Menge im Eiklar (siehe Tabelle 3).

Auf Grund dieser minimalen Konzentrationen scheint die Dotter-IgA-Menge für die weiteren Untersuchungen vernachlässigbar klein.

In keiner der Dotterpräparationen konnte, wie von Yamamoto et al. (1975) beschrieben, IgM nachgewiesen werden.

4.2.2. Vergleich der Immunglobulinkonzentrationen und -mengen im Eiklar des unbebrüteten Eies mit denen des Dottersackinhaltes am 21. Tag der Brut

Die Frage, ob am Ende der Brut im Dottersack des Hühnerembryos größere Immunglobulinkonzentrationen nachweisbar sind, als sie nach der Eiablage im Eiklar gefunden werden, wäre auf elegante Art zu beantworten, wenn die Immunglobulinmengen eines frisch gelegten Eies mit denen des selben Eies nach 21 Tagen der Inkubation verglichen werden könnten.

Eiklar stellt aber keine homogene, gut pipettierbare Lösung dar. Vielmehr setzt es sich aus einer äußeren, dünnflüssigen, einer mittleren, dickflüssigen und einer inneren, dünnflüssigen Schicht zusammen und ist im frischen Zustand hoch viskös (Romanoff und Romanoff, 1949). Eine, das ganze Eiklar repräsentierende Probe, ist ohne vorherige Präparation nicht zu erhalten.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die, an aufeinanderfolgenden Tagen von einer Henne gelegten Eier, abwechselnd entweder nach der Eiablage oder am Ende der Brut untersucht (siehe Punkt 3.3.). So war es möglich, das ganze Eiklar eines Eies zu gewinnen und zur Immunglobulinbestimmung zu präparieren.

Heller (1975) wies auf die stark schwankenden Immunglobulinkonzentrationen im Dotter von in Folge gelegten Eiern hin. Bei den eigenen Messungen (Tabelle I bis VIII) wurden derartige, tägliche Unterschiede der Immunglobulinkonzentrationen auch im Eiklar festgestellt. Verdeutlicht wird dies durch die oft recht großen Abweichungen von den Stichprobenmittelwerten. So wurde für die Eiklarproben der Henne 887 ein Mittelwert der IgM-Menge von 0,762 mg bestimmt, die Standardabweichung betrug 0,437 mg, und die Einzelwerte erreichten Extreme von 0,276 mg bis zu 1,447 mg. Auch in den übrigen Gruppen waren deutliche Differenzen zu finden, wenn auch nicht in dem für die Henne 887 aufgezeigten Ausmaß.

Um trotz dieser Schwankungen zu einer sicheren Aussage zu kommen, war es nötig, eine ausreichend große Zahl von Stichproben zu untersuchen.

Die gemessenen Konzentrationen des Immunglobulins M von durchschnittlich 0,057 mg/ml stimmen mit den von Rammensee (1984) gefundenen Werten überein (siehe Tabelle 2). Rose et al. (1974) geben Konzentrationen von 0,15 mg/ml an, ermittelten diesen Wert allerdings in der doppelten Immundiffusion, einer Technik, die nicht als quantitative Meßmethode beschrieben ist.

IgA wurde in den eigenen Untersuchungen mit 0,087 mg/ml im Durchschnitt aller Eiklarproben gemessen. Rammensee gab demgegenüber nur 0,008 mg/ml an, wogegen Rose et al. (1974) 10 mal mehr IgA im Eiklar bestimmten.

Diese teilweise erheblichen Unterschiede zwischen den Angaben der Literatur und den eigenen Daten lassen sich dadurch erklären, daß bei sehr kleinen Stichprobenumfängen Tiere mit sehr hohen oder sehr niedrigen Immunglobulinkonzentrationen das Ergebnis stark beeinflussen. Im vorliegenden Datenmaterial werden sowohl die täglichen als auch die individuellen Schwankungen deutlich. Es sollten daher stets nur Tiere untersucht werden, deren Serumimmunglobulinkonzentrationen im Bereich der beschriebenen, physiologischen Werte liegen. Wie aus dem Vergleich der Tabelle 4 mit den Angaben der Serumwerte der Tabelle 2 zu ersehen ist, wurde diese Forderung in der vorliegenden Untersuchung erfüllt.

In der Literatur existiert nur eine einzige Angabe zu den IgM- und IgA-Konzentrationen im Dottersack des Hühnerembryos. Rammensee (1984) fand beim Eintagküken 0,34 mg/ml IgM und 0,11 mg/ml IgA im Dottersack. Die Mittelwerte der eigenen Messungen am 21. Tag der Embryonalentwicklung lagen bei 0,149 mg IgM und 0,207 mg IgA pro ml Dottersackinhalt. Der höchste Wert wurde für IgM bei einem Nachkommen der Henne 886 (Tabelle III) mit 0,391 mg/ml ermittelt und der niedrigste mit 0,021 mg/ml bei einem Nachkommen der Henne 887 (Tabelle V). Auch aus diesen Angaben wird ersichtlich, daß nur große Stichprobenumfänge eine Aussage über mittlere Immunglobulinkonzentrationen zulassen.

Durch Multiplikation der bestimmten Konzentrationen mit dem Volumen des Eiklars bzw. des Dottersackinhaltes wurden die Gesamtmengen der Immunglobuline in diesen Kompartimenten ermittelt. Die gemessenen Volumina der jeweiligen Proben (Tabelle 5) entsprechen den Angaben der Literatur (Romanoff und Romanoff, 1949; Romanoff, 1960).

Die Einzelwerte und die errechneten Mittelwerte der Immunglobulinkonzentrationen und Immunglobulinmengen können den Tabellen I bis VIII entnommen werden. Vergleichbare Angaben existieren in der Literatur nicht.

Aus den Daten wird ersichtlich, daß der Dottersack am 21. Tag der Embryonalentwicklung sowohl IgM als auch IgA in Konzentrationen enthält, die über denen des Eiklars liegen. Wegen seines weitaus größeren Volumens ergeben sich demgegenüber aber signifikant höhere Gesamtmen- gen beider Immunglobuline für das Eiklar.

Die von Rammensee (1984) gefundene Zunahme der IgM-Menge bei gleich- bleibender IgA-Menge war nicht nachvollziehbar.

Eine embryonale oder extraembryonale Immunglobulinsynthese konnte somit nicht bewiesen werden.

Dennoch ist eine embryonale Immunglobulinsynthese auf Grund dieser Ergebnisse nicht auszuschließen, zumal der Ursprung der Dottersackim- munglobuline ungeklärt ist. Die Alternativhypothese, daß diese aus dem Eiklar stammen, ist bisher nicht untersucht worden.

Ein Teil der Eiklarimmunglobuline gelangt nach der Perforation der sero-amniotischen Verbindung (siehe Punkt 1.2.) in die Amnionflüssig- keit und von dort in den Verdauungstrakt (Rose et al., 1974); die Größe dieses Anteils ist unbekannt. Die Menge der im Eiklar verbliebe- nen Immunglobuline nimmt aber um diesen Betrag ab und somit auch die Immunglobulinmenge, die demzufolge nach dem 14. Tag der Inkubation aus dem Eiklar in den Dottersack gelangen könnte. Angesichts dieser Über- legungen sollte der ermittelte Unterschied zwischen den Eiklarimmun- globulinkonzentrationen am Tag der Eiablage und denen des Dottersackes am 21. Tag der Embryonalentwicklung erst im Zusammenhang mit den übrigen Ergebnissen beurteilt werden.

Darüberhinaus ist ein Übertritt von Eiklarimmunglobulinen in den Dot- tersack und eine gleichzeitige de novo-Synthese durch den Hühnerembryo denkbar.

4.2.3. Vergleich der Molekulargewichte der Eiklar- und Dottersackim- munglobuline IgM und IgA

Die Immunglobuline IgM und IgA liegen bei den Säugetieren (Tizard, 1987) und beim Haushuhn (Übersichten bei: Benedict und Berestecky, 1987; Higgs, 1975) in Form verschieden großer Polymere vor. Über die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Eiklar- und Dottersackimmun- globuline dieser Isotypen gibt es aber bisher keine Untersuchungen.

Im Zusammenhang mit der hier gestellten Frage können durch einen

Molekulargewichtvergleich zwischen den entsprechenden Immunglobulinen des Eiklars und des Dottersackes weitere Informationen erhalten werden. Der Nachweis unterschiedlicher Molekülgrößen zwischen den jeweiligen Immunglobulinen dieser Kompartimente würde die These einer embryonalen Immunglobulinsynthese unterstützen.

IgM kommt im Serum des Haushuhns in zwei Formen vor (Schraner und Löscher, 1986). Den weitaus größten Anteil an der Gesamtmenge hat die pentamere Form mit einem Molekulargewicht von 890.000 (Higgins, 1975) bzw. 920.000 Dalton (Schraner und Löscher, 1986). Auf Grund seiner Größe ist IgM nahezu ausschließlich im Serum zu finden und seine Bedeutung in Gewebsflüssigkeiten und Sekreten eher gering (Tizard, 1987). Um so bemerkenswerter ist die Sekretion von IgM in das Eiklar und dessen Auftreten im Dottersack des Hühnerembryos.

Die hier ermittelten Molekulargewichte des Immunglobulins IgM in den drei Kompartimenten Serum, Eiklar und Dottersack entsprachen einander, wie in Abbildung 6 zu erkennen ist. Monomere IgM-Moleküle oder andere Polymerisationsgrade wurden weder im Eiklar noch im Dottersack gefunden.

IgA ist demgegenüber der bedeutendste Immunglobulin-Isotyp in den Körpersekreten und auf den inneren und äußeren Körperoberflächen (Steward, 1984; Hood et al., 1984). Im Hühnerserum sind sowohl monomere als auch dimere IgA-Moleküle beschrieben (Leslie und Martin, 1973a; Schraner und Löscher, 1986). Übereinstimmend werden Molekulargewichte von 170.000 bis 180.000 Dalton für die monomere und 340.000 bis 360.000 Dalton für die dimere Form angegeben.

Daneben gibt es bei den Säugetieren eine dritte Form des Immunglobulins IgA (Tizard, 1987), die als sekretorisches IgA (sIgA) bezeichnet wird, da sie die Form des Immunglobulins in den Körpersekreten darstellt.

Auch beim Haushuhn wurde seine Existenz auf Grund zahlreicher Hinweise seit langem vermutet (Benedict und Berestecky, 1987). Der Nachweis der sekretorischen Komponente - heute eher als Poly-Ig-Rezeptor bezeichnet (Williams, 1984) - im IgA der Gallenflüssigkeit des Haushuhns gelang Peppard et al. (1986). Sie geben für die sekretorische Komponente ein Molekulargewicht von 80.000 Dalton an.

Dieser Arbeit zufolge liegt das Gallen-IgA des Haushuhns als Tetramer vor. Der Angabe entsprechen eigenen Befunde, wonach die IgA-Bande in der SDS-Page über der Thyreoglobulin-Bande (MG: 669.000 Dalton) und

unter der IgM-Bande (MG: 920.000 Dalton) lag. Das Molekulargewicht ist bisher nicht exakt bestimmt worden; aus den angegebenen Daten kann ein Wert von 760.000 Dalton errechnet werden.

Im Immunoblotting ist zu erkennen (Abbildung 6), daß Eiklar- und Dottersack-IgA in der SDS-Page die gleichen Laufstrecken zurücklegen. Aus diesem Ergebnis kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß von der Henne in das Eiklar abgegebenes IgA dieselbe Struktur aufweist wie das sekretorische IgA der Gallenflüssigkeit und damit ebenfalls als Tetramer mit einer sekretorischen Komponente vorliegt.

Die gleiche Aussage kann auf Grund der Immunoblots auch für das Dottersack-IgA getroffen werden.

Da erst kürzlich ein Antiserum gegen die sekretorische Komponente des Haushuhns entwickelt werden konnte (Peppard et al., 1986), fehlen bislang Angaben über die embryonale oder neonatale Entwicklung des sekretorischen Systems.

Sollte das Dottersack-IgA aus einer embryonalen Eigensynthese stammen, so müßte gleichzeitig mit dem B-Zellsystem auch das sekretorische System funktionsfähig sein und dies bereits ab dem 14. Tag der Embryonalentwicklung, denn von diesem Zeitpunkt an ist das sIgA-Analog im Dottersackinhalt nachweisbar (Rammensee, 1984).

Auch diese Untersuchungen gaben keine Hinweise auf eine Synthese der Dottersackimmunglobuline IgM und IgA. Vielmehr scheint, bei Berücksichtigung der unter Punkt 4.2.1. diskutierten Ergebnisse, ein Übertritt der Eiklarimmunglobuline in den Dottersackinhalt zunehmend wahrscheinlicher.

Insbesondere das Auftreten des Immunglobulins IgA in der sekretorischen Form, lange vor dem frühest möglichen Nachweis von Serum-IgA (Leslie et al., 1976; eigene Untersuchungen siehe Punkt 3.5.3.4.3.), stellt die Hypothese einer embryonalen Synthese in Frage.

4.2.4. Am Modell agammaglobulinämischer Hennen gewonnene Ergebnisse

Die sich aus der Verteilung der maternalen Immunglobuline ergebende Schwierigkeit, den Beginn einer Immunglobulinsynthese beim Küken direkt nachzuweisen, wurde bereits verdeutlicht (siehe Punkt 1.3.).

Eine Unterscheidung eigener, das heißt vom Embryo oder Küken syntheti-

sierter und mütterlicher IgM-Moleküle, wäre auf Grund allotypischer Variationen möglich. Notwendig wäre dazu aber die Verfügbarkeit entsprechender Hühnerlinien (Benedict, 1979; Hala, 1987) und die Durchführung eines speziellen Zuchtprogrammes. Beide Voraussetzungen bestanden am Institut nicht.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die weiteren Untersuchungen am Tiermodell der agammaglobulinämischen Henne durchgeführt.

4.2.4.1. Aufzucht, Haltung und Immunstatus bursektomierter Hennen

Merkenschlager et al. (1967) beschrieben die Haltung von gnotobiotischen Küken. Aufbauend auf diesen Kenntnissen wurde die Aufzucht und Haltung der agammaglobulinämischen Hennen durchgeführt.

Die sich aus dem immunologischen Status der Tiere ergebenden Probleme, werden durch die Tabellen 6 bis 10 in Abschnitt 3.5.1. verdeutlicht. Danach gelang es, aus 90 behandelten Eiern 6 legende Hennen aufzuziehen. Drei der Tiere wuchsen zunächst im Isolator auf, die übrigen drei Hennen wurden von Beginn an im Isolierraum gehalten. Dieses Datenmaterial läßt keinen Schluß auf eine zu bevorzugende Haltungsform zu. Der große hygienische Aufwand, der während eines Zeitraums von 11 Monaten betrieben wurde, führte letztendlich zum Gelingen des Versuchsvorhabens. Auf die Vorteile einer Haltung immunsupprimierter Tiere in einem mikrobiell kontrollierten Milieu wies Gruber (1975) hin.

Vier legende Hennen entstammten der Tiergruppe (Gruppe III), in der ausschließlich eine Cyclophosphamidbehandlung erfolgte. Die Tiere Nr. 167 und 297 wiesen zeitweilig extrem niedrige Serum-IgM und -IgG-Werte auf. Auch wenn diese Tiere strenggenommen nicht als agammaglobulinä-misch zu bezeichnen sind, so konnten sie doch in das weitere Versuchsprogramm mit einbezogen werden, zumal erst zum Versuchsende in Eiern der Henne 167 IgG nachweisbar war (siehe Punkt 3.5.3.).

In einem, erst kürzlich am Institut entwickelten ELISA-System, wurden die Serumproben der bursektomierten Hennen zusätzlich untersucht. Die Erfassungsgrenze des Testes lag bei 100 ng/ml. In den Seren, die schon zuvor in der Rocket-Immunelektrophorese keine Präzipitate bildeten, konnten auch mit Hilfe der ELISA-Technik keine Immunglobuline nachgewiesen werden. Diese Hennen können als definitiv agammaglobulin-ä-misch bezeichnet werden.

Ob eine alleinige Cyclophosphamidbehandlung zur Gewinnung agammaglobulinämischer Tiere ausreichend ist, wurde häufig diskutiert. Die entsprechende Literatur ist in der Einleitung zusammengefaßt. Aus den eigenen Ergebnissen lassen sich hierzu, auf Grund des geringen Zahlenmaterials, keine statistisch sicheren Aussagen ableiten; allerdings weisen die Befunde bei den Hennen 167 und 297 darauf hin, daß eine Agammaglobulinämie auf diesem Weg nicht regelmäßig zu erreichen ist.

4.2.4.2. Untersuchungen an Embryonen agammaglobulinämischer Hennen

Nachdem sechs Hennen die Legereife erreicht hatten, stand für die Beantwortung der Frage nach einer embryonalen Immunglobulinsynthese ein geeignetes Modell zur Verfügung (siehe Punkt 1.6).

Der Nachweis von Immunglobulinen der drei Immunglobulin-Isotypen IgG, IgM und IgA gelang weder bei 16 noch bei 21 Tage alten Hühnerembryonen. Dagegen waren Küken derselben agammaglobulinämischen Hennen nach dem Schlupf durchaus in der Lage, Immunglobuline zu bilden (siehe Punkt 3.5.3.4.).

Die Dottersackimmunglobuline IgM und IgA entstammen demzufolge nicht einer Synthese durch embryonales und extraembryonales Gewebe. Daher kann aus dem Ergebnis gefolgert werden, daß diese Immunglobuline während der Embryonalentwicklung vom 14. Tag der Inkubation an aus dem Eiklar in den Dottersack gelangen. Wenn auch der direkte Beweis für diesen Vorgang noch fehlt, so muß er doch als sehr wahrscheinlich bezeichnet werden, da nach dem Ausschluß einer de novo-Synthese außer dem Eiklar keine weiteren Ursprungsorte vorhanden sind.

Die Tatsache, daß auch die Molekulargewichte beider Immunglobulin-Isotypen im Eiklar und im Dottersackinhalt einander jeweils entsprechen, unterstützt diese These.

Erklärlich wird in dem Zusammenhang auch der Nachweis geringerer IgM- und IgA-Mengen im Dottersack am 21. Tag der Inkubation als im Eiklar des frisch gelegten Eies.

IgM und IgA werden der Überlegung zufolge bei der Passage durch den Eileiter von der Henne in das dort gebildete Eiklar abgegeben. Nach der Perforation der sero-amniotischen Verbindung am 11. Tag, gelangen Eiklar und mit ihm auch die Immunglobuline in die Amnionflüssigkeit. Diese wird vom Embryo ab dem 10.-12. Tag der Inkubation abgeschluckt, wodurch ein Teil der Eiklarimmunglobuline in den Verdauungstrakt ge-

langt.

Der größere Anteil der Eiklarimmunglobuline wird auf noch ungeklärtem Weg in den Dottersackinhalt abgegeben. Denkbar wäre ein Übertritt der gelösten Immunglobuline während der Verflüssigung des Dottersackinhaltes durch den Einstrom von Wasser aus dem Eiklar ab dem 3. Tag der Embryonalentwicklung. Saito und Martin (1966) beschreiben eine starke Zunahme wasserlöslicher Proteine im Dottersackinhalt nach dem 12. Tag der Inkubation. Ihrer Aussage zufolge trifft diese Zunahme mit dem Auftreten einer neuen Proteinfraction zusammen, die offensichtlich dem Eiklar entstammt. Sie identifizierten dieses Protein als Ovalbumin. Weitere Veränderungen des Proteinmusters konnten sie auf Grund des starken Anstiegs des Ovalbumins nicht nachweisen.

Ob die wasserlöslichen Immunglobuline des Eiklars gleichzeitig mit dem Ovalbumin in den Dottersack übertreten und wie dieser Vorgang abläuft, bleibt noch zu klären.

Ein direkter Übertritt von Eiklar in den Dottersack am Dottersackumbilicus wurde von Hanan (1927) nachgewiesen, das Volumen dieses Eiklaranteils allerdings nicht bestimmt. Auch auf diesem Weg wäre der Übergang der Eiklarimmunglobuline auf den Dottersackinhalt denkbar.

Drei Fragestellungen ergeben sich aus den bisherigen Ausführungen.

1. Zu welchem Zeitpunkt beginnt die Antikörpersynthese beim Haushuhn?
2. Wie gelangen die maternalen Immunglobuline IgM und IgA in das Eiklar?
3. Werden diese Immunglobuline tatsächlich vom Eiklar in den Dottersack übertragen?

4.2.4.3. Untersuchung der Serumimmunglobulinkonzentrationen der Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen während des ersten Lebensmonats

Der Zeitpunkt, zu dem die Immunglobuline IgM bzw. IgA erstmalig im Serum nachweisbar sind, wurde bereits mehrfach beschrieben (Lösch, 1972; Martin und Leslie, 1973a).

Der Beginn der IgG-Synthese konnte dagegen noch nicht exakt bestimmt werden, da der Nachweis neugebildeter Immunglobuline durch die hohen maternalen Immunglobulinspiegel im Serum der Küken kompliziert wird (Rose und Orlans, 1981).

Leslie (1975) versuchte an wenigen Nachkommen von Hennen mit einer starken IgG-Hypogammaglobulinämie das Auftreten neugebildeter Immunglobuline dieses Isotyps zeitlich zu erfassen. Er beschreibt den 3. bis 6. Tag nach dem Schlupf. Den 11. Lebenstag geben dagegen Khattab und Craig (1970) auf Grund ihrer Studien mit anti-Allotyp-Antiseren an.

An Hand einer Gruppe von 15 Küken, die von agammaglobulinämischen Hennen abstammten, konnte nun erstmals der Beginn der IgG-Synthese beim Haushuhn exakt bestimmt und darüberhinaus die Entwicklung der Serum-Immunglobulinkonzentrationen im ersten Lebensmonat verfolgt werden.

Bereits am 2. Lebenstag wurde bei einem Tier IgG nachgewiesen; 90% der Tiere begannen in der ersten Lebenswoche mit der IgG-Synthese. Die Abbildung 7 verdeutlicht dies im Vergleich mit der Kontrollgruppe und läßt den, für IgM (Lösch, 1972) und IgA (Leslie und Martin, 1972) bereits beschriebenen, gleichmäßigen Anstieg der Serum-IgG-Konzentration in der Gruppe der Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen erkennen. Dagegen verläuft die Entwicklung der Serum-IgG-Konzentrationen in der Kontrollgruppe auffallend anders. Bereits am Tag des Schlupfes werden Werte um 5 mg/ml Serum bestimmt. Dieser und die weiteren Werte stimmen mit den Angaben von Lösch (1972) sehr gut überein. Zu erkennen ist ein weiterer Anstieg der IgG-Konzentrationen am 2. bzw. 3. Tag und anschließend ein Abfall bis zum 15. Lebenstag. Von da an werden wieder zunehmend höhere Konzentrationen gemessen, welche auf die beginnende IgG-Synthese durch das Küken zurückzuführen sind. Umfangreiche Untersuchungen dieser Vorgänge finden sich bei Brierley und Hemmings (1956), Van Meter et al. (1969), Lösch (1972), Martin und Leslie (1973a) und Leslie (1975).

Beim Vergleich der Serum-IgG-Konzentrationen der Kontrollgruppe mit denen der Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen an den jeweils gleichen Tagen fällt folgendes auf: in der Kontrollgruppe steigt ab dem 16. Lebenstag die IgG-Konzentration wieder an, allerdings deutlich schneller als in der Gruppe der Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen im gleichen Zeitraum.

So ergibt sich für die Kontrollgruppe eine Differenz von 1,854 mg/ml zwischen dem 16. und dem 30. Tag, für die Vergleichsgruppe dagegen nur eine solche von 0,598 mg/ml. Bereits dieses Ergebnis weist auf einen Unterschied in der Entwicklung des humoralen Immunsystems beider Gruppen hin, welcher bei dem Vergleich der Serumkonzentrationen von IgM und IgA noch deutlicher wird.

IgM ist als erstes Immunglobulin im Serum der Küken nachweisbar. Während Martin und Leslie (1973a) den Synthesebeginn auf den 4. Lebenstag datierten, konnte Lösch (1972) schon 24 Stunden nach dem Schlupf erstmals IgM im Küken Serum nachweisen. Die vorliegenden Daten bestätigen diese Befunde und stimmen auch mit jüngeren Literaturangaben gut überein (Rose und Orland, 1981).

Zwei Küken der hier untersuchten Kontrollgruppe wiesen schon wenige Stunden nach dem Schlupf IgM im Serum auf, alle Küken hatten Immunglobuline dieses Isotyps bis zum 6. Tag gebildet. Lösch (1972) beschrieb auch den gleichmäßigen Anstieg der Serum-IgM-Konzentration während des ersten Lebensmonats. Er gab die Konzentrationen als Relativwerte zu einem Kontrollserum an. In der Literatur waren, ebenso wie für das IgA, keine weiteren Arbeiten über die Entwicklung der Serumimmunglobulinkonzentrationen zu finden, so daß die vorliegenden Daten bezüglich der Normalwerte nicht diskutiert werden können.

Die IgA-Synthese beginnt relativ spät. Erst ab dem 6. Lebenstag, meist erst mit Beginn der zweiten Lebenswoche, werden sehr geringe IgA-Konzentrationen gemessen, die dann gleichmäßig weiter ansteigen (siehe Tabelle XIII, XIV und XVII). Martin und Leslie (1973) geben an, daß IgA im Serum nicht vor dem 12. Lebenstag zu erfassen ist.

Betrachtet man die Abbildungen 8 und 9, so wird jeweils der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Nachkommen der agammaglobulinämischen Hennen augenfällig. Dieser Unterschied konnte für den Vergleich der IgM-Gruppen ab dem 8. Tag und für den Vergleich der IgA-Gruppen ab dem 12. Tag für jeden weiteren Zeitpunkt statistisch gesichert werden.

Demnach ist das humorale Immunsystem dieser Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen nicht in der Lage, die volle Funktionsfähigkeit ebenso schnell zu erreichen, wie das der Küken, die von immunologisch intakten Hennen abstammen. Die Aussage kann in Bezug auf die IgM- und IgA-Bildung getroffen werden; sie wird aber durch die Interpretation der Daten des Immunglobulins IgG bestätigt.

Der Beginn der Immunglobulinsynthese war allerdings im Vergleich bei den Gruppen für den jeweiligen Immunglobulin-Isotyp zeitgleich.

Vor einer weiteren Interpretation der Daten muß zunächst an einen systematischen Fehler gedacht werden. Dieser Überlegung ist entgegenzuhalten, daß die Tiere einer Zuchtlinie entstammten, im selben Stall, im selben Zeitraum unter identischen Bedingungen aufgezogen wurden und die Blutentnahme und Probenaufarbeitung stets nach dem selben Schema erfolgten.

Die Ursache für die unterschiedlichen Entwicklungen scheint demnach eher auf Seiten des Immunsystems zu liegen.

Denkbar wäre dabei einmal, daß der langsamere Anstieg der Immunglobulinkonzentrationen bei den Küken der agammaglobulinämischen Hennen Ausdruck einer allgemein verzögerten Entwicklung ist. Die Küken waren Nachkommen immunologisch stark geschädigter Hennen, deren Allgemeinbefinden häufig schlechter war als das der Kontrollhennen. Sich daraus ergebende schlechtere Entwicklungsbedingungen für die Küken können sicherlich auch das Immunsystem mit beeinflussen. Die Wirkungen einer Fehl- oder Unterernährung auf das Immunsystem sind komplex und vielfach noch unverstanden. Allgemein reduzieren schwere Fehlernährungen die T-Zellfunktion und somit auch die zellvermittelte Immunantwort. Zahlreiche weitere Effekte sind beschrieben, sollen an dieser Stelle aber nicht angesprochen werden. Eine Übersicht findet sich bei Tizard (1987).

Demgegenüber bleiben Überlegungen zur direkten Beeinflussung des sich entwickelnden Immunsystems weitgehend hypothetisch. Denkbar wäre beispielsweise, daß die maternalen Immunglobuline das B-Zell-System des Kükens zu einer schnelleren Proliferation anstoßen. Allerdings wäre dann mit dem Beginn der Eigensynthese eine Beschleunigung der Antikörpersekretion auf Grund einer Selbststimulation zu erwarten.

Eine Überprüfung der aufgezeigten Ergebnisse, unter besonderer Beachtung der allgemeinen Entwicklung der Küken, sollte weiteren Interpretationen vorausgehen. Eine Bestätigung gäbe dann allerdings Anlaß zu weiteren intensiven Untersuchungen dieses Phänomens.

4.2.5. Intravenöse Injektion der Immunglobuline IgM und IgA in agammaglobulinämische Legehennen. Untersuchung der Übertragung auf das Ei.

Patterson et al. (1962a und b) und Kowalczyk et al. (1985) beschrieben den Transfer von δ -Globulinen bzw. IgG in den reifenden Eifollikel der Legehenne. Demgegenüber sind Übertragungsweg, Menge und Kinetik der IgM- und IgA-Sekretion in das Eiklar bisher weniger gut verstanden (Rose und Orlans, 1981). Durch intravenöse Injektion einer hochkonzentrierten Immunglobulinlösung in legende, agammaglobulinämische Hennen sollte die Sekretion dieser Immunglobuline in das Eiklar unter-

sucht werden, um so die weiter oben (siehe Punkt 4.2.4.2.) gestellte Frage nach deren Ursprung zu beantworten. Zugleich ergab sich die Möglichkeit die Halbwertszeiten beider Immunglobuline aus den Eliminationskurven zu berechnen und aus deren Verlauf zusätzliche Informationen über die Verteilung der Immunglobuline aus dem Serum in andere Kompartimente zu erhalten.

Die nach der Proteininjektion erreichten Serum-IgM-Konzentrationen lagen bei beiden Hennen über 1 mg/ml und damit im Bereich der angegebenen Normalwerte (siehe Tabelle 2 und 4).

Bei der Henne 290 konnte nach der Injektion auch eine Serum-IgA-Konzentration gemessen werden, die im unteren Bereich der beschriebenen, physiologischen Werte lag (Rammensee, 1984; siehe auch Tabelle 2 und 4).

Dagegen scheinen sich die injizierten Immunglobuline bei der Henne 167 trotz ihres geringeren Körpergewichtes, in einem größeren Plasmavolumen verteilt zu haben. Der Serum-IgA-Wert erreichte 0,074 mg/ml, 1/5 des angegebenen Durchschnittswertes. Obwohl die Injektionslösung eine höhere IgM-Konzentration enthielt als die für die Henne 290 (siehe Tabelle 11), war die Serumkonzentration nach der Injektion auch hier vergleichsweise niedrig.

Die Zahl der Blutentnahmen wurde im Versuch bewußt klein gehalten, um die Tiere möglichst wenig zu stören und so eine regelmäßige Legetätigkeit sicherzustellen. Zur Berechnung der Halbwertszeiten reichte das gewonnene Datenmaterial aus.

Für das IgM ergaben sich Halbwertszeiten von 1,4 bzw. 1,8 Tagen. Leslie und Clem (1970) ermittelten einen durchschnittlichen Wert von 1,7 Tagen an drei untersuchten Tieren. Die Einzelwerte waren 1,6, 1,8 und 1,7 Tage. Sie fanden zudem eine rasche Elimination des Immunglobulins IgM während der ersten 48 Stunden nach der Injektion. Aus den eigenen Daten konnte dieser Vorgang einer Verteilung zwischen intra- und extravasalem Raum nicht abgeleitet werden. Vielmehr lagen alle Meßpunkte, nachdem sie im halblogarithmischen Maßstab aufgetragen worden waren, auf einer Geraden (siehe Abbildung 10 und 11).

Dohms et al. (1978) kamen beim Truthahn zu dem gleichen Ergebnis, und auch für das Kaninchen (Taliaferro und Talmage, 1956) und den Menschen (Cohen und Freeman, 1960) wurde beschrieben, daß sich IgM hauptsächlich im intravasalen Raum verteilt.

Über die Halbwertszeit des Immunglobulins IgA im Serum des Haushuhns gibt es bislang keine Angaben (Benedict und Berestecky, 1987). Die hier ermittelten Zeiten betrugen 3,3 und 1,9 Tage. Der bei der Henne

167 bestimmte höhere Wert ist wegen der oben geschilderten geringen Anfangskonzentration vorsichtig zu interpretieren.

Für den Truthahn fanden Dohms et al. (1978) bei zwei Tieren IgA-Halbwertszeiten von 1,92 und 1,68 Tagen. Offenbar liegen die Werte beim Haushuhn mit etwa 1,9 Tagen und beim Truthahn mit 1,68 bis 1,92 Tagen unter denen der Säugetiere und des Menschen, für die Halbwertszeiten von 4 bis 5 Tagen angegeben sind (Tizard, 1987). Ein ähnlicher Unterschied wurde auch für die Immunglobuline IgM und IgG gefunden und kann vielleicht auf den höheren Grundumsatz der Vögel zurückgeführt werden.

Aus dem Verlauf der IgM-Eliminationskurve kann ein weiterer Schluß gezogen werden. Während des Untersuchungszeitraums von 11 bzw. 14 Tagen fand keine Verteilung oder Sekretion des injizierten Immunglobulins IgM statt, da der Kurvenverlauf einer einfachen Exponentialfunktion entspricht. Die gleiche Aussage kann auch für das IgA getroffen werden. Bereits diese Daten deuten darauf hin, daß keine Immunglobulinsekretion aus dem Serum der Henne in das Eiklar erfolgt. Nur wenn der metabolische Abbau und eine Sekretion in das Eiklar oder in ein anderes Kompartiment die gleichen Eliminationsgeschwindigkeiten aufwiesen, was sehr unwahrscheinlich ist, bliebe der Kurvenverlauf durch den gleichzeitigen Ablauf zweier Eliminationsvorgänge unbeeinflusst.

Um den Befund zu überprüfen, wurden Eier beider Hennen auf die Immunglobuline IgM und IgA untersucht. Weder vor noch nach Injektion der immunglobulinhaltigen Lösungen waren diese Immunglobuline im Eiklar erfassbar. Die von Rose und Orlans (1981) ausgesprochene Vermutung, daß die Eiklarimmunglobuline nicht aus dem Serum der Henne stammen, konnte durch diesen Versuch an legenden, agammaglobulinämischen Hennen bewiesen werden.

Auch Dohms et al. (1978) fanden bei ihren Studien am Truthuhn, nach Injektion entsprechend markierter Immunglobuline, so geringe Radioaktivität im Eiklar wieder, daß sie dieses Resultat als nicht interpretierbar bezeichneten.

Beurteilt man beide Ergebnisse zusammen, so ist die Überlegung, daß bei den agammaglobulinämischen Hennen in Folge der Bursektomie auch das Transportsystem für die Immunglobuline funktionsunfähig war, unwahrscheinlich. Zudem müßten in einem solchen Fall die Epithelzellen des Ovidukts geschädigt sein, denn diese Zellen bilden den Poly-Ig-Rezeptor, der das Transportprotein für Immunglobuline darstellt (Williams, 1984).

Lebacqz-Verheyden et al. (1972) fanden zahlreiche IgA-haltige Zellen im Ovidukt. Daraus schlossen Rose und Orlans (1981) auf eine Synthese der Eiklarimmunglobuline durch Plasmazellen in der Schleimhaut des Ovidukts. Die Befunde der vorliegenden Untersuchung unterstützen diese Theorie. Die Sekretion von Immunglobulinen in das Eiklar wäre danach mit der Abgabe des Immunglobulins IgA in die Körpersekrete (Tizard, 1987) vergleichbar. Eine weitere Bestätigung erhält diese Überlegung durch den Nachweis der sekretorischen Form des Immunglobulins IgA im Eiklar (siehe Punkt 4.2.3.).

4.3. Abschließende Besprechung der Ergebnisse

Zahlreiche Arbeiten (zusammengefaßt bei Rose und Orlans, 1981) befassen sich mit der Übertragung maternalen Antikörper auf das Hühnerküken seit Klemperer (1893) erstmals über diesen Vorgang berichtete. Besondere Aufmerksamkeit galt dabei dem Immunglobulin IgG, nicht zuletzt weil es, im Vergleich mit den anderen Immunglobulinen, in den mit Abstand höchsten Konzentrationen im Serum (Leslie und Clem, 1969) und Eidotter (Lösch, 1972) vorkommt.

Wenig bekannt ist dagegen in diesem Zusammenhang über die Immunglobuline IgM und IgA.

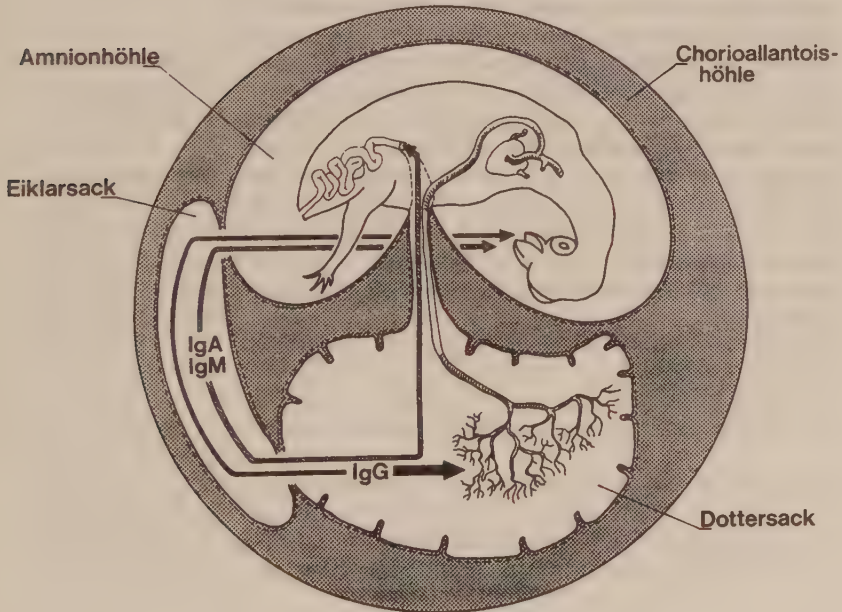
Stärker noch als an der passiv erworbenen Immunität, ist die immunologische Forschung an der aktiv erworbenen Immunität, also der Ontogenese des Immunsystems interessiert. Streng voneinander trennbar sind beide Vorgänge aber nicht. Auf die Bedeutung des Haushuhns in diesem Zusammenhang wurde bereits in der Einleitung hingewiesen. An dieser Stelle sollen einige wenige Aspekte nochmals zusammenfassend erörtert werden.

Die Sekretion des Immunglobulins IgG in den Dotter und dessen Verteilung im Hühnerembryo wurden unter Punkt 1.3.1. ausführlich geschildert. Die geringen IgA-Mengen im Dotter spielen bei den weiteren Überlegungen nur eine untergeordnete Rolle.

IgM und IgA werden, nach den Erkenntnissen dieser Arbeit, offensichtlich nicht aus dem Serum in das Eiklar abgegeben. Mit hoher Wahrscheinlichkeit entstammen sie Plasmazellen in der Schleimhaut des Ovidukts und werden dort gleich in das sich bildende Eiklar abgegeben. Von dort gelangt der größere Anteil beider Immunglobuline auf noch unbekanntem Weg ab dem 14.Tag der Embryonalentwicklung (Rammensee,

1984) in den Dottersack.

Der verbliebene Rest tritt, nach der Perforation der sero-amniotischen Verbindung am 11. Tag der Embryonalentwicklung, mit dem Eiklar in die Amnionflüssigkeit über. Dadurch, daß die Amnionflüssigkeit vom 10.-12. Tag an abgeschluckt wird, gelangen die Immunglobuline weiter in den Verdauungstrakt. Hier tragen sie zur lokalen Immunität während der ersten Lebenstage bei. Vermutlich werden auch die in den Dottersack übertragenen Immunglobuline am Ende der Brut und in den ersten Tagen nach dem Schlupf durch die sich in diesem Zeitraum entwickelnde Kontraktilität der Dottersackhaut über den Dottersackstiel in den Darm gepreßt (Jordanov und Anastassova-Kristeva, 1963). Eine Resorption und Aufnahme in den Kreislauf des Kükens findet nach übereinstimmender Ansicht nicht statt (Ziegelmaier, 1969; Übersicht bei Higgins, 1975). Die folgende Darstellung soll diese Vorgänge noch einmal verdeutlichen.



Wenn auch der Übergang der Immunglobuline IgM und IgA aus dem Eiklar in den Dottersack noch nicht direkt bewiesen werden konnte, so ist er doch sehr wahrscheinlich, nachdem die von Lösch und Schumacher (1971) vermutete embryonale Synthese und Sekretion dieser Immunglobuline ausgeschlossen werden konnte. Bis zum Schlupf der Küken waren bei den Nachkommen der agammaglobulinämischen Hennen keine Immunglobuline im Dottersack und in der Amnionflüssigkeit nachweisbar. Im Serum trat IgM erstmals wenige Stunden nach dem Schlupf auf.

Der Beginn der IgM- und IgA-Synthese und -Sekretion ist bereits seit langem beschrieben. Für das IgM wurde der erste (Lösch, 1972) bzw. 4. Lebenstag (Martin und Leslie, 1973a und b) angegeben und für das IgA der 10. bis 12. Tag (Martin und Leslie, 1973b). Die Bestimmung dieser Zeitpunkte war unproblematisch, da störende, maternale Immunglobuline im Serum der Küken nicht auftraten.

Maternale IgG-Antikörper, vom Küken ab dem 12. Tag der Embryonalentwicklung aus dem Dottersack in den Kreislauf resorbiert (Kramer und Cho, 1970), machten bis heute die Bestimmung des Synthese- und Sekretionsbeginns dieses Immunglobulin-Isotyps durch das Küken schwierig. Bereits ab dem 2. Lebenstag konnte in dieser Arbeit vom Küken gebildetes IgG im Serum der Tiere sicher nachgewiesen werden.

Eine Immunglobulinsynthese - nicht aber eine Sekretion - durch embryonale B-Zellen findet dagegen sehr viel früher statt; schon am 12. Tag der Embryonalentwicklung ist IgM im Cytoplasma und auf der Zelloberfläche von B-Zellen in der Bursa Fabricii zu finden (Lydyard et al., 1976). Einleitend wurde die Literatur bereits besprochen.

Offenbar sind aber noch eine Reihe weiterer, bisher weitgehend unbekannter Reifungsvorgänge nötig, bis eine solche B-Zelle oder deren Nachkommen nach der Expression der Immunglobuline diese auch sezernieren. Thorbecke et al. (1968), Marinkovich und Baluda (1966) und Lifter et al. (1976) gelang es in vitro embryonale B-Zellen zur Immunglobulinsekretion zu bringen, ohne aber die Entwicklung der in Kultur genommenen Zellen genauer zu untersuchen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Ursprung der Immunglobuline IgM und IgA im Dottersack des Hühnerembryos konnte bisher nicht geklärt werden.

Die vorliegende Arbeit baut auf der Hypothese auf, daß ein Teil dieser Immunglobulin-Isotypen bereits während der Brut durch embryonales oder extraembryonales Gewebe synthetisiert und sezerniert wird. Um diesen Vorgang nachzuweisen, sollte der Beginn der Immunglobulinsynthese der drei beim Haushuhn beschriebenen Isotypen IgG, IgM und IgA bestimmt werden.

Eine embryonale Eigensynthese war durch den Vergleich der IgM- und IgA-Gesamtmenen frisch gelegter Eier mit denen der Dottersäcke am 21. Tag der Inkubation nicht nachweisbar. Die Mengen beider Immunglobuline waren im Eiklar signifikant höher als im Dottersack am Ende der Embryonalentwicklung.

Zusätzlich konnten am Tag der Eiablage erstmals im Dotter sehr geringe Konzentrationen ($8 \mu\text{g/ml}$) des Immunglobulins IgA nachgewiesen werden.

Die Molekulargewichte der Eiklar- und Dottersackimmunglobuline IgM und IgA wurden in der SDS-Page und im Immunoblot verglichen, um an Hand eventueller Unterschiede im Polymerisationsgrad Hinweise auf eine de novo-Synthese zu erhalten. Die Molekulargewichte der jeweiligen Isotypen beider Kompartimente waren gleich.

Sechs agammaglobulinämische Hennen, deren Immundefekt durch chemische Bursektomie erzeugt wurde, konnten bis zur Legereife aufgezogen werden. An Nachkommen dieser Hennen wurde der Beginn der Immunglobulinsekretion bestimmt.

Im Dottersackinhalt und in der Amnion- und Allantoisflüssigkeit 16 Tage alter Embryonen und im Dottersackinhalt 21 Tage alter Embryonen waren keine neu gebildeten Immunglobuline nachweisbar. Die Erfassungsgrenze der angewandten Methode lag für das IgM bei $0,008 \text{ mg/ml}$ und für das IgA bei $0,003 \text{ mg/ml}$.

Im Serum der Küken agammaglobulinämischer Hennen konnte IgM vom 2. Lebenstag und IgA von der 2. Lebenswoche an nachgewiesen werden.

Erstmals war es auch möglich den Beginn der IgG-Eigensynthese exakt zu bestimmen. Dieses Immunglobulin war ebenfalls vom 2. Lebenstag an

erfaßbar.

Während des ersten Lebensmonats nahm die Serumkonzentration der Immunglobuline IgM und IgA gleichmäßig zu, der Anstieg war jedoch signifikant langsamer als der bei einer Kontrollgruppe bestimmte; hierauf wird in der Diskussion näher eingegangen.

Auf Grund dieser Befunde ist eine Synthese und Sekretion der Dottersackimmunglobuline IgM und IgA durch embryonales oder extraembryonales Gewebe auszuschließen. Sehr wahrscheinlich entstammen sie dem Eiklar und sind somit maternalen Ursprungs.

Am Modell der agammaglobulinämischen Henne wurde durch intravenöse Injektion einer konzentrierten Lösung der Immunglobuline IgM und IgA deren Übertragung von der Henne auf das Eiklar untersucht. Eier dieser Hennen enthielten nach der Injektion keine Immunglobuline. Auch aus dem Verlauf der Serumeliminationskurven konnte keine Verteilung in ein anderes Kompartiment abgeleitet werden.

Die gleichzeitig bestimmten Halbwertszeiten dieser Immunglobuline betrugen für das IgM 1,4 bzw. 1,8 Tage und für das IgA 1,9 bzw. 3,3 Tage.

Eine Übertragung maternalen Antikörper aus dem Serum in das Eiklar findet nicht statt. Offensichtlich werden sie im Ovidukt gebildet und gleich in das Eiklar abgegeben.

6. SUMMARY

Investigations on the transfer of maternal immunoglobulins and the ontogenesis of immunoglobulin synthesis in the domesticated chicken

To date the origin of the immunoglobulins IgM and IgA in the yolk sac of chicken embryos could not be ascertained.

This study is based on the hypothesis that a part of these immunoglobulin isotypes are synthesized and secreted by embryonic or extraembryonic tissue during the brood period. In order to trace this process, the begin of synthesis of the three immunoglobulin isotypes known to occur in chickens (IgG, IgM and IgA) was to be determined.

A comparison of the total IgA and IgM amounts in fresh laid eggs and in yolk sacs of 21 day old embryos gave no indication of immunoglobulin synthesis by the embryo. The amounts of both immunoglobulins were significantly higher in the egg white than in the yolk sac at the end of embryonic development.

In addition, very small concentrations of IgA ($8 \mu\text{g/ml}$) were first detected on the day the egg was layed.

A comparison of the molecular weight of the egg white and yolk sac immunoglobulins IgM and IgA was carried out with the SDS-Page and the Immunoblot technique. Possible differences in the degree of polymerisation could have been an indication for de novo synthesis. The molecular weight of the individual isotypes was the same in both compartments.

Six agammaglobulinemic hens (with chemically induced bursectomy) could be reared and achieved egg-laying maturity.

The begin of immunoglobulin synthesis was determined on the offspring of these hens. No newly synthesized immunoglobulins could be found either in the contents of the yolk sac, amnion and allantois of 16 day old embryos or in the yolk sac contents of 21 day old embryos. The detection threshold of the methods used was for IgM $0,008 \text{ mg/ml}$ and for IgA $0,003 \text{ mg/ml}$.

IgM could be demonstrated in the serum of chicks of the agammaglobulinemic hens after the second day of life and IgA after the second week of life.

For the first time it also was possible to exactly ascertain the begin of IgG synthesis by the chick. This immunoglobulin was demonstrable in 2 day old chicks.

During the first month of life the serum IgA and IgM concentrations

increased proportionally, the increase was, however, significantly slower than in a control group. This situation is elicited upon in more detail in the discussion.

Based on these results the possibility can be ruled out that embryonic or extraembryonic tissue synthesizes and secretes the yolk sac immunoglobulins IgM and IgA. It is probable that they originate from the egg white and are therefore of maternal origin.

The transfer of IgM and IgA from the hen to the egg white was examined using the agammaglobulinemic hen as a model. For this purpose a concentrated solution of these immunoglobulins was injected intravenously. After the injection eggs from this hens did not contain any immunoglobulins. From the course of the serum elimination graph it was not possible to find evidence for a distribution of the immunoglobulins to another compartment.

The simultaneously determined half life of these immunoglobulins in two hens was 1.4 and 1.8 days for IgM and 1.9 and 3.3 days for IgA, respectively.

A transfer of maternal antibodies from the serum of the hen to the egg white does not occur. Apparently they are synthesized in the oviduct and are immediately passed on to the egg.

7. TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle I

Vergleich der IgM-Konzentrationen und IgM-Mengen
im Eiklar und Dottersack
Henne 713

Datum der Eiablage	im Eiklar am Tag der Eiablage		im Dottersack am 21. Tag der Brut	
	IgM (mg/ml)	IgM (mg)	IgM (mg/ml)	IgM (mg)
15.7.	0,046	1,610		
17.7.	0,034	1,020		
18.7.			0,044	0,311
22.7.			0,047	0,342
24.7.	0,048	1,440		
25.7.			0,043	0,387
26.7.	0,040	1,320		
27.7.			0,188	0,945
28.7.	0,044	1,560		
30.7.	0,029	1,015		
31.7.			0,060	0,430
1.8.			0,080	0,585
2.8.	0,034	1,050		
5.8.	0,033	1,073		
8.8.			0,029	0,292
9.8.	0,042	1,414		
10.8.			0,037	0,285
14.8.	0,060	1,740		
16.8.	0,049	1,789		
17.8.			0,039	0,3 50
n =	11	11	9	9
$\bar{x}$ =	0,042	1,366	0,063	0,436
SD =	0,009	0,292	0,049	0,212

Tabelle II

Vergleich der IgA-Konzentrationen und IgA-Mengen
im Eiklar und Dottersack
Henne 713

Datum der Eiablage	im Eiklar am Tag der Eiablage		im Dottersack am 21. Tag der Brut	
	IgA (mg/ml)	IgA (mg)	IgA (mg/ml)	IgA (mg)
15.7.	0,022	0,770		
17.7.	0,029	0,870		
18.7.			0,112	0,802
22.7.			0,113	0,814
24.7.	0,068	2,040		
25.7.			0,103	0,915
26.7.	0,033	1,090		
28.7.	0,035	1,243		
30.7.	0,019	0,630		
31.7.			0,074	0,528
1.8.			0,111	0,816
2.8.	0,040	1,240		
8.8.			0,051	0,506
10.8.			0,079	0,616
14.8.	0,038	1,073		
17.8.			0,066	0,604
n =	8	8	8	8
$\bar{x}$ =	0,034	1,120	0,089	0,700
SD =	0,015	0,432	0,024	0,154

Tabelle III

Vergleich der IgM-Konzentrationen und IgM-Mengen
im Eiklar und Dottersack
Henne 886

Datum der Eiablage	im Eiklar am Tag der Eiablage		im Dottersack am 21. Tag der Brut	
	IgM (mg/ml)	IgM (mg)	IgM (mg/ml)	IgM (mg)
28.7.	0,080	2,425		
29.7.			0,220	2,202
30.7.	0,092	2,656		
31.7.			0,314	2,607
1.8.	0,127	2,797		
2.8.			0,259	2,205
3.8.			0,233	2,058
4.8.			0,198	1,820
6.8.	0,085	2,809		
8.8.			0,212	1,779
9.8.	0,073	2,399		
10.8.	0,060	2,055		
14.8.	0,073	2,457		
15.8.	0,089	3,187		
21.8.	0,114	3,741		
23.8.			0,291	2,827
26.8.			0,391	2,343
28.8.			0,370	2,889
29.8.			0,310	2,266
30.8.			0,285	2,336
1.9.	0,068	2,136		
2.9.	0,086	2,898		
3.9.			0,251	1,858
4.9.	0,061	2,133		
5.9.			0,300	2,496
6.9.			0,237	1,969
7.9.	0,075	2,187		
10.9.	0,108	3,507		
12.9.	0,121	3,758		
13.9.			0,256	1,793
14.9.	0,105	2,993		
19.9.	0,076	2,272		
20.9.			0,351	2,284
n =	17	17	16	16
$\bar{x}$ =	0,088	2,730	0,280	2,233
SD =	0,021	0,556	0,057	0,349

Tabelle IV

Vergleich der IgA-Konzentrationen und IgA-Mengen
im Eiklar und Dottersack
Henne 886

Datum der Eiablage	im Eiklar am Tag der Eiablage		im Dottersack am 21. Tag der Brut	
	IgA (mg/ml)	IgA (mg)	IgA (mg/ml)	IgA (mg)
28.7.	0,044	1,328		
29.7.			0,149	1,493
30.7.	0,065	1,894		
31.7.			0,240	1,996
1.8.	0,095	2,088		
2.8.			0,201	1,710
3.8.			0,175	1,540
4.8.			0,202	1,862
6.8.	0,067	2,213		
9.8.	0,052	1,729		
10.8.	0,045	1,525		
14.8.	0,061	2,038		
15.8.	0,101	3,596		
21.8.	0,104	3,409		
23.8.			0,198	1,924
26.8.			0,262	1,573
28.8.			0,272	2,120
29.8.			0,205	1,499
1.9.	0,067	2,126		
2.9.	0,072	2,446		
3.9.			0,250	2,544
6.9.			0,233	1,936
7.9.	0,081	2,365		
10.9.	0,090	2,923		
12.9.	0,092	2,853		
13.9.			0,336	2,354
14.9.	0,086	2,460		
19.9.	0,074	2,219		
20.9.			0,358	2,331
n =	17	17	14	14
$\bar{x}$ =	0,074	2,315	0,242	1,909
SD =	0,019	0,606	0,061	0,336

Tabelle V

Vergleich der IgM-Konzentrationen und IgM-Mengen
im Eiklar und Dottersack
Henne 887

Datum der Eiablage	im Eiklar am Tag der Eiablage		im Dottersack am 21. Tag der Brut	
	IgM (mg/ml)	IgM (mg)	IgM (mg/ml)	IgM (mg)
27.6.	0,032	0,858		
28.6.	0,049	1,427		
29.6.			0,043	0,359
2.7.	0,046	1,343		
3.7.			0,048	0,389
5.7.	0,053	1,447		
6.7.			0,045	0,312
8.7.			0,045	0,362
10.7.			0,044	0,347
15.7.	0,019	0,525		
16.7.			0,069	0,410
17.7.	0,017	0,515		
20.7.	0,019	0,535		
22.7.			0,058	0,486
23.7.	0,026	0,562		
28.7.			0,067	0,540
29.7.			0,021	0,261
30.7.	0,008	0,276		
4.8.	0,018	0,495		
5.8.			0,044	0,389
6.8.	0,013	0,398		
7.8.			0,039	0,311
n =	11	11	11	11
$\bar{x}$ =	0,027	0,762	0,048	0,379
SD =	0,016	0,437	0,013	0,080

Tabelle VI

Vergleich der IgA-Konzentrationen und IgA-Mengen
im Eiklar und Dottersack
Henne 887

Datum der Eiablage	im Eiklar am Tag der Eiablage		im Dottersack am 21. Tag der Brut	
	IgA (mg/ml)	IgA (mg)	IgA (mg/ml)	IgA (mg)
27.6.	0,062	1,674		
28.6.	0,066	1,924		
29.6.			0,099	0,837
2.7.	0,061	1,793		
3.7.			0,108	0,876
5.7.	0,067	1,836		
6.7.			0,128	0,894
8.7.			0,129	1,042
10.7.			0,138	1,086
15.7.	0,050	1,399		
16.7.			0,195	1,151
17.7.	0,049	1,472		
20.7.	0,041	1,129		
22.7.			0,128	1,076
23.7.	0,050	1,071		
28.7.			0,165	1,323
29.7.			0,093	1,116
30.7.	0,030	0,945		
4.8.	0,050	1,405		
5.8.			0,137	1,208
6.8.	0,042	1,275		
7.8.			0,137	1,004
n =	11	11	11	11
$\bar{x}$ =	0,052	1,448	0,132	1,056
SD =	0,012	0,328	0,029	0,148

Tabelle VII

Vergleich der IgM-Konzentrationen und IgM-Mengen
im Eiklar und Dottersack
Henne 888

Datum der Eiablage	im Eiklar am Tag der Eiablage		im Dottersack am 21. Tag der Brut	
	IgM (mg/ml)	IgM (mg)	IgM (mg/ml)	IgM (mg)
5.8.			0,184	1,937
9.8.	0,050	1,946		
10.8.			0,177	1,844
12.8.	0,062	2,383		
15.8.	0,057	2,178		
16.8.			0,075	0,872
17.8.	0,054	1,995		
18.8.			0,088	1,116
19.8.	0,067	2,287		
20.8.			0,152	1,585
21.8.	0,046	1,868		
24.8.			0,126	1,388
25.8.	0,055	1,989		
26.8.			0,161	1,274
27.8.			0,135	1,321
28.8.			0,158	1,340
29.8.	0,063	1,937		
30.8.			0,130	1,365
31.8.	0,047	1,704		
1.9.	0,054	1,926		
2.9.	0,050	1,795		
3.9.			0,132	0,979
4.9.	0,069	2,204		
8.9.			0,101	1,131
9.9.	0,070	2,442		
10.9.	0,052	1,944		
11.9.			0,151	1,210
12.9.	0,060	2,147		
16.9.	0,046	1,619		
19.9.	0,052	1,740		
20.9.			0,125	1,167
n =	17	17	14	14
$\bar{x}$ =	0,056	2,006	0,135	1,324
SD =	0,008	0,236	0,032	0,299

Tabelle VIII

Vergleich der IgA-Konzentrationen und IgA-Mengen
im Eiklar und Dottersack
Henne 888

Datum der Eiablage	im Eiklar am Tag der Eiablage		im Dottersack am 21. Tag der Brut	
	IgA (mg/ml)	IgA (mg)	IgA (mg/ml)	IgA (mg)
5.8.			0,439	4,607
9.8.	0,145	5,638		
10.8.			0,189	1,969
12.8.	0,145	5,548		
15.8.	0,137	5,168		
16.8.			0,338	3,954
17.8.	0,121	4,408		
18.8.			0,405	4,622
19.8.	0,150	5,108		
20.8.			0,540	5,616
21.8.	0,125	5,067		
24.8.			0,345	3,796
25.8.	0,134	4,834		
26.8.			0,058	0,455
27.8.			0,106	1,038
28.8.			0,177	1,501
29.8.	0,154	4,758		
30.8.			0,449	4,719
31.8.	0,131	4,731		
1.9.	0,147	5,295		
2.9.	0,193	6,862		
3.9.			0,489	3,616
4.9.	0,166	5,288		
8.9.			0,236	2,645
9.9.	0,156	5,456		
10.9.	0,160	5,952		
11.9.			0,301	2,408
12.9.	0,161	5,805		
16.9.	0,136	4,830		
19.9.	0,137	4,600		
20.9.			0,200	1,862
n =	17	17	14	14
$\bar{x}$ =	0,147	5,256	0,305	3,058
SD =	0,017	0,599	0,149	1,576

In den Tabellen IX bis XVII sind die Serum-Immunglobulinkonzentrationen der Nachkommen agammaglobulinämischer und unbehandelter Hennen zusammenfassend dargestellt.

- Ein - Zeichen gibt an, daß diese Probe nicht untersucht wurde.
- Eine 0 besagt, das in der Probe mit dem angewandten Test keine Immunglobuline nachweisbar waren.
- Steht ein <-Zeichen vor der Konzentrationsangabe, so lagen die gemessenen Immunglobulinkonzentrationen der Probe unterhalb des kleinsten, noch quantitativ erfaßbaren Wertes.

Bei der Mittelwertberechnung wurde für Proben ohne nachweisbare Immunglobuline der Wert 0 eingesetzt. Die mit einem <-Zeichen kenntlich gemachten Meßergebnisse wurden mit $1/2$ des angegebenen Wertes eingerechnet. Die Immunglobulinkonzentration einer solchen Probe kann jeden Wert zwischen 0 und dem angegebenen, kleinsten noch quantitativ erfaßbaren Wert annehmen. Fehler, die sich aus diesem Berechnungsmodus ergeben, sind in Relation zu den später gemessenen Werten vernachlässigbar.

Tabelle IX

Konzentration des Immunglobulins IgG im Serum der Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen
(=Gruppe A)

Küken Nr./ Geschlecht

Tag der Blut- entnahme nach dem Schlupf	122 m	123 m	128 m	133 m	132 w	134 w	136 w	$\bar{x}$	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0,029	0	0	0	0	0,004	0,011
4	0	0	0,020	0	0	0	0	0,003	0,007
6	0	0,013	0,038	0,069	0,051	0,070	<0,008	0,040	0,026
8	0	0,020	0,048	0,082	0,078	0,089	0,037	0,055	0,034
10	0	0,026	0,084	0,094	0,085	0,107	0,068	0,069	0,040
12	0	0,030	0,175	0,112	0,126	0,119	0,089	0,096	0,060
14	0,021	0,040	0,257	0,130	0,147	0,174	0,111	0,121	0,082
16	0,038	0,087	0,284	0,178	0,160	0,248	0,085	0,149	0,082
18	0,060	0,170	0,329	0,251	0,208	0,293	0,086	0,200	0,101
20	0,097	0,258	0,619	0,280	0,257	0,307	0,098	0,274	0,175
22	0,125	0,232	0,706	0,408	0,348	0,527	0,219	0,366	0,201
24	0,151	0,359	0,729	0,565	0,354	0,818	0,219	0,456	0,254
26	0,171	0,359	0,856	0,691	0,565	0,903	0,236	0,540	0,293
28	0,217	0,489	0,890	0,734	0,557	1,112	0,127	0,589	0,353
30	0,290	0,619	1,064	0,951	0,632	1,327	0,346	0,747	0,382

Tabelle X

Konzentration des Immunglobulins IgG im Serum der Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen (in mg/ml)
(=Gruppe B)

Küken Nr./ Geschlecht

Tag der Blut-
entnahme nach
dem Schlupf

	124 m	125 m	127 m	129 m	130 m	131 m	126 w	135 w	$\bar{x}$	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0,030	0	0	0,052	0	0,009	0	0,011	0,020
5	0	0,022	0,040	0,024	0,052	0,019	0,014	0,079	0,031	0,025
7	0,015	0,035	0,062	0,044	0,045	0,066	0,021	0,092	0,048	0,025
9	0,020	0,057	0,084	0,064	0,059	0,080	0,047	0,092	0,063	0,023
11	0,036	0,035	0,135	0,117	0,072	0,116	0,069	0,105	0,086	0,038
13	0,067	0,061	0,164	0,144	0,085	0,173	0,087	0,125	0,113	0,044
15	0,113	0,057	0,208	0,197	0,092	0,188	0,097	0,138	0,136	0,056
17	0,143	0,070	0,244	0,343	0,105	0,238	0,101	0,152	0,175	0,093
19	0,176	0,072	0,445	0,628	0,132	0,281	0,257	0,152	0,268	0,185
21	0,235	0,079	0,654	0,728	0,144	0,393	0,319	0,119	0,334	0,245
23	0,263	0,101	0,695	0,640	0,194	0,527	0,348	0,312	0,385	0,214
25	0,442	0,138	0,917	0,688	0,224	0,607	0,377	0,119	0,439	0,283
27	0,470	0,157	1,028	1,056	0,414	0,692	0,602	0,114	0,567	0,353
29	0,897	0,252	1,213	1,137	-	0,817	0,574	0,131	0,717	0,417

Tabelle XI

Konzentration des Immunglobulins IgM im Serum der Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen (in mg/ml)
(=Gruppe A)

Küken Nr./ Geschlecht

Tag der Blut- entnahme nach dem Schlupf	122 m	123 m	128 m	133 m	132 w	134 w	136 w	$\bar{x}$	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	<0,008	<0,008	0,011	0	<0,008	0	0	0,003	0,004
4	0,012	0,008	0,014	<0,008	<0,008	<0,008	<0,008	0,007	0,004
6	0,019	0,021	0,027	0,018	0,024	0,015	0,013	0,020	0,009
8	0,021	0,027	0,036	0,053	0,061	0,042	0,017	0,037	0,017
10	0,021	0,008	0,130	0,110	0,084	0,124	0,053	0,080	0,053
12	0,039	0,055	0,299	0,145	0,110	0,128	0,154	0,133	0,085
14	0,052	0,075	0,217	0,284	0,196	0,237	0,097	0,165	0,090
16	0,072	0,090	0,135	0,343	0,209	0,248	0,138	0,176	0,096
18	0,082	0,094	0,272	0,319	0,281	0,272	0,121	0,206	0,102
20	0,130	0,209	0,198	0,287	0,228	0,258	0,237	0,221	0,050
22	0,206	0,243	0,191	0,579	0,362	0,489	0,265	0,334	0,150
24	0,257	0,269	0,279	0,489	0,396	0,555	0,265	0,359	0,123
26	0,299	0,286	0,264	0,611	0,367	0,734	0,534	0,442	0,185
28	0,395	0,367	0,293	0,631	0,395	0,829	0,726	0,519	0,207
30	0,597	0,521	0,337	-	-	-	-	0,489	0,134

Tabelle XII

Konzentration des Immunglobulins IgM im Serum der Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen (in mg/ml)
(=Gruppe B)

Küken Nr./Geschlecht

Tag der Blut- entnahme nach dem Schlupf	124 m	125 m	127 m	129 m	130 m	131 m	126 w	135 w	$\bar{x}$	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0,029	0,008	0,009	0,013	<0,008	0,009	<0,008	0,010	0,009
5	0,014	0,008	0,020	0,023	0,020	0,017	0,014	0,018	0,017	0,009
7	0,009	0,024	0,027	0,040	0,026	0,031	0,021	0,026	0,026	0,011
9	0,018	0,034	0,049	0,073	0,038	0,054	0,047	0,033	0,043	0,017
11	0,030	0,060	0,072	0,221	0,067	0,215	0,069	0,087	0,103	0,073
13	0,064	0,092	0,077	0,214	0,105	0,259	0,087	0,154	0,132	0,071
15	0,057	0,101	0,084	0,240	0,118	0,269	0,097	0,201	0,146	0,079
17	0,082	0,116	0,247	0,274	0,118	0,269	0,101	0,284	0,186	0,089
19	0,101	0,128	0,286	0,422	0,131	0,281	0,257	0,228	0,229	0,107
21	0,222	0,261	0,352	0,422	0,190	0,243	0,319	0,506	0,314	0,108
23	0,293	0,355	0,375	0,648	0,225	0,386	0,348	0,642	0,409	0,154
25	0,379	0,386	0,574	0,443	0,341	0,396	0,377	0,684	0,448	0,119
27	0,347	0,620	0,271	0,514	0,369	0,520	0,602	0,835	0,510	0,181
29	0,401	0,684	0,249	0,611	0,708	0,670	0,574	1,026	0,615	0,229

Tabelle XIII

Konzentration des Immunglobulins IgA im Serum der Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen (in mg/ml)
(=Gruppe A)

Küken Nr. / Geschlecht

Tag der Blut- entnahme nach dem Schlupf	122 m	123 m	128 m	133 m	132 w	134 w	136 w	$\bar{x}$	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0,003	0,004	0	0	0
8	<0,003	0	0	0,018	0,006	0,011	0	0,001	0,002
10	<0,003	0	0,028	0,049	0,034	0,035	0,016	0,008	0,008
12	0,004	0,006	0,049	0,063	0,065	0,028	0,078	0,032	0,027
14	0,008	0,014	0,067	0,072	0,068	0,029	0,127	0,049	0,043
16	0,013	0,022	0,083	0,078	0,052	0,025	0,107	0,052	0,036
18	0,019	0,023	0,067	0,084	0,009	0,038	0,054	0,047	0,028
20	0,027	0,041	0,075	0,099	0,094	0,080	0,046	0,041	0,027
22	0,027	0,050	0,073	0,183	0,123	0,148	0,044	0,066	0,028
24	0,056	0,064	0,073	0,177	0,101	0,158	0,009	0,088	0,065
26	0,065	0,077	0,088	0,168	0,158	0,196	0,006	0,091	0,060
28	0,127	0,111	0,091	0,173	0,157	0,195	0	0,107	0,069
							0	0,122	0,065

Tabelle XIV

Konzentration des Immunglobulins IgA im Serum der Nachkommen agammaglobulinämischer Hennen (in mg/ml)
(=Gruppe B)

Küken Nr. / Geschlecht

Tag der Blut-
entnahme nach
dem Schlupf

	124 m	125 m	127 m	129 m	130 m	131 m	126 w	135 w	$\bar{x}$	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0,003	0,002	0	0,005	0	0	0,013	0,008
9	0	0,003	0,011	0,018	0,010	0,014	0	0	0,007	0,010
11	0,002	0,007	0,032	0,018	0,063	0,043	0,007	0	0,022	0,023
13	0,011	0,014	0,048	0,022	0,085	0,054	0,022	0,008	0,033	0,027
15	0,015	0,025	0,054	0,014	0,063	0,087	0,037	0,008	0,038	0,028
17	0,015	0,032	0,071	0,033	0,048	0,059	0,049	0,018	0,041	0,020
19	0,018	0,035	0,132	0,044	0,058	0,046	0,088	0,023	0,056	0,038
21	0,016	0,046	0,178	0,056	0,064	0,104	0,125	0,042	0,079	0,053
23	0	0,042	0,190	0,072	0,064	0,1328	0,135	0,101	0,093	0,061
25	0	0,049	0,193	0,068	0,071	0,158	0,147	0,121	0,101	0,065
27	0	0,049	0,369	0,064	0,100	0,206	0,146	0,104	0,130	0,115
29	0	0,134	0,409	0,100	0,164	0,203	0,151	0,104	0,158	0,118

Tabelle XV

Konzentration des Immunglobulins IgG im Serum der Nachkommen unbehandelter Hennen (in mg/ml)
(=Kontrollgruppe)
Küken Nr./ Geschlecht

Tag der Blut- entnahme nach dem Schlupf	138 m	140 m	141 m	142 m	143 m	139 w	144 w	$\bar{x}$	SD
0	8,103	2,461	0,205	11,577	5,281	5,512	7,511	5,807	3,751
2	8,773	3,266	0,384	12,213	6,745	7,616	10,282	7,040	4,067
4	6,595	2,863	0,205	10,307	5,307	6,468	10,019	5,966	3,633
6	5,422	2,327	0,147	8,084	4,508	4,556	7,247	4,613	2,733
8	5,087	2,059	0,147	6,814	3,549	3,599	5,399	3,795	2,220
10	3,429	1,656	0,185	5,543	3,389	3,409	4,211	2,686	1,640
12	3,134	1,522	0,224	5,226	2,750	2,070	3,947	2,657	1,691
14	2,838	1,388	0,301	4,273	2,910	2,261	3,551	2,503	1,333
16	2,838	1,522	0,454	3,638	2,990	2,261	3,156	2,408	1,097
18	2,543	2,059	0,742	3,320	2,910	2,261	3,419	2,465	0,915
20	3,550	2,327	1,114	3,529	3,670	2,542	3,469	2,873	0,953
22	3,442	2,229	1,236	3,600	3,458	2,914	3,621	2,929	0,897
24	4,367	3,485	1,823	3,811	4,517	3,046	3,774	3,546	0,909
27	4,235	3,566	1,846	3,952	4,376	3,178	4,079	3,607	0,871
30	4,103	3,728	2,188	6,635	5,223	3,574	4,384	4,262	1,394

Tabelle XVI

Konzentration des Immunglobulins IgM im Serum der Nachkommen unbehandelter Hennen (in mg/ml)
(=Kontrollgruppe)
Küken Nr./Geschlecht

Tag der Blut- entnahme nach dem Schlupf	138 m	140 m	141 m	142 m	143 m	140 w	144 w	$\bar{x}$	SD
0	-	<0,008	<0,008	-	-	-	-	0,001	0,002
2	-	<0,008	<0,008	<0,008	-	<0,008	-	0,002	0,002
4	-	0,022	0,008	0,008	0,015	0,010	-	0,010	0,010
6	0,020	0,029	0,019	0,015	0,026	0,021	0,010	0,022	0,009
8	0,067	0,064	0,059	0,073	0,050	0,148	0,075	0,077	0,033
10	0,184	0,074	0,227	0,178	0,098	0,215	0,143	0,160	0,058
12	0,233	0,158	0,193	0,352	0,210	0,261	0,351	0,251	0,076
14	0,188	0,540	0,206	0,343	0,214	0,272	0,381	0,306	0,126
16	0,188	0,254	0,264	0,522	0,348	0,400	0,441	0,345	0,118
18	0,566	0,280	0,277	0,604	0,402	0,496	0,522	0,450	0,133
20	0,452	0,341	0,345	0,755	0,944	0,496	0,399	0,533	0,230
22	0,539	0,518	0,358	0,708	0,849	0,402	0,399	0,539	0,181
24	0,578	0,567	0,351	0,661	1,038	0,362	0,575	0,575	0,234
27	0,766	0,617	0,382	0,849	1,179	0,587	0,686	0,724	0,249
30	0,885	0,617	0,481	1,415	1,474	0,825	0,487	0,883	0,413

Tabelle XVII
Konzentration des Immunglobulins IgA im Serum der Nachkommen unbehandelter Hennen (in mg/ml)
(=Kontrollgruppe)
Küken Nr./ Geschlecht

Tag der Blut- entnahme nach dem Schlupf	138 m	140 m	141 m	142 m	143 m	139 w	144 w	$\bar{x}$	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	<0,003	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0,010	0,008	0,032	0,022	0,014	0	0,012	0,012
10	0,059	0,022	0,073	0,070	0,050	0,067	0,032	0,053	0,020
12	0,105	0,077	0,126	0,154	0,120	0,091	0,126	0,114	0,026
14	0,098	0,108	0,142	0,134	0,152	0,099	0,155	0,127	0,025
16	0,105	0,094	0,171	0,156	0,176	0,123	0,163	0,141	0,033
18	0,130	0,094	0,183	0,171	0,173	0,119	0,149	0,146	0,033
20	0,141	0,094	0,190	0,227	0,295	0,115	0,215	0,182	0,071
22	0,191	0,082	0,203	0,287	0,272	0,106	0,211	0,193	0,077
24	0,197	0,092	0,204	0,257	0,332	0,130	0,351	0,223	0,097
27	0,303	0,099	0,301	0,362	0,407	0,188	0,335	0,285	0,106
30	0,381	0,092	0,275	0,453	0,468	0,200	0,390	0,323	0,139

Tabelle XVIII

IgM- und IgA-Mengen und -Konzentrationen im Eiklar des frisch gelegten Eies und des Dottersackes am 21. Tag der Brut (Errechnete Mittelwerte und Standardabweichungen)

		Eiklar am Tag der Eiablage (Henne Nr.)				Dottersack am 21.Tag der Brut (Henne Nr.)			
		713	886	887	888	713	886	887	888
IgM (mg/ml)	$\bar{x}$	0,042	0,088	0,027	0,056	0,063	0,280	0,048	0,135
	SD	0,009	0,021	0,016	0,008	0,049	0,057	0,013	0,032
	n	11	17	11	17	9	16	11	14
IgM (mg)	$\bar{x}$	1,366	2,730	0,762	2,006	0,436	2,233	0,379	1,324
	SD	0,292	0,556	0,437	0,236	0,212	0,349	0,080	0,299
	n	11	17	11	17	9	16	11	14
IgA (mg/ml)	$\bar{x}$	0,034	0,074	0,052	0,147	0,089	0,242	0,132	0,305
	SD	0,015	0,019	0,012	0,017	0,024	0,061	0,029	0,149
	n	8	16	11	17	8	13	11	14
IgA (mg)	$\bar{x}$	1,120	2,325	1,448	5,256	0,700	1,914	1,056	3,058
	SD	0,432	0,624	0,328	0,599	0,154	0,349	0,148	1,576
	n	8	16	11	17	8	13	11	14

8. LITERATURVERZEICHNIS

ALBINI, B. and WICK, G.

Ontogeny of lymphoid cell surface determinants in the chicken.
Int. Archs Allergy appl. Immun. 48, 513-529 (1975)

ANDREWS, A.T.

Electrophoresis: theory, techniquis and biochemical and clinical applications.
Oxford University Press, Oxford (1986)

BENEDICT, A.A.

Immunglobulin characteristics: chicken, in: inbred and genetical-ly defined strains of laboratory animals, Part 2, Biological Handbook III.
Fed. Am. Soc: Exp. Biol., Bethesda, Md. (1979)

BENEDICT, A.A. and BERESTECKY, J.M.

Special features of avian immunoglobulins.
In: Avian Immunology: basis and practice (Ed.: Toivanen and Toivanen)
CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl. (1987)

BJERRUM, O.J. and SCHAFER-NIELSEN, C.

Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblott-
ing with a horizontal apparatus.
Electrophoresis 86, 315-319 (1986)

BRAMBELL, F.W.R.

The transmission of passive immunity from mother to young.
In: Frontiers of Biology
North-Holland Publishing Company Amsterdam, London (1970)

BRIERLEY, J. and HEMMINGS, W.A.

The selective transport of antibodies from the yolk sac to the circulation of the chick.
J. Embryol. exp. Morphol. 4, 34-41 (1956)

BUDOWLE, B.

Increasing the sensitivity of protein detection of a silverstain for agarose gels.

Electrophoresis 5, 174-175 (1984)

COHEN, S. and FREEMAN, T.

Metabolic heterogeneity of human gamma globulin.

Biochem. J. 76, 475-487 (1960)

DOHMS, I.E., SAIF, Y.M. and BACON, W.L.

Metabolism and passiv transfer of immunoglobulins in the turkey hen.

Am. J. Vet. Res. 39, 1472-1481 (1978)

FISCHER, H.

The nutrition of birds.

In: Avian Biology Vol. 2

Academic Press, New York (1972)

GLICK, B., CHANG, T.S. and JAAP, R.G.

The bursa of Fabricius and antibody production in the domestic fowl.

Poultry Science 35, 224-226 (1956)

GLICK, B. and SADLER, C.R.

The elimination of the bursa of Fabricius and reduction of antibody production in birds from eggs dipped in hormone solution.

Poultry Sci. 40, 185-189 (1961)

GLICK, B.

Morphological changes and humoral immunity in cyclophosphamide-treated chicks.

Transplantation 11, 433-439 (1971)

GLICK, B. and McDUFFIE, F.C.

Immunoglobulin and the bursa of Fabricius.

J. Reticuloendothel. Soc. 17, 119-125 (1975)

GLICK, B.

How it all began: the continuing story of the bursa of Fabricius.
in: Avian Immunology.: Basis and practice (Ed.: Toivanen and
Toivanen)
CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl. (1987)

GRABER, P., WILLIAMS, C.A.

Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électro-
phorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines; appli-
cation au sérum Sanguin.
Biochem. biophys. Acta 10, 193-206 (1953)

GRANFORS, K., MARTIN, C., LASSILA, O., SUVITAIVAL, R., TOIVANEN, A.
and TOIVANEN, P.

Immune capacity of the chicken bursectomized at 60 h of inkuba-
tion. Production of the immunoglobulins and specific antibodies.
Clin. Immunol. Immunopathol. 23, 459-469 (1982)

GROSSI, C.E., LYDYARD, P.M. and COOPER, M.D.

Ontogeny of B cells in the chicken.
J. Immunology 119, 749-756 (1977)

GRUBER, F.

Immunologie der Versuchstiere.
In: Schriftreihe Versuchstierkunde 3
Paul Parey Verlag (1975)

HALA, K.

Inbred lines of avian species.
In: Avian Immunology.: Basis and practice (Ed.: Toivanen and
Toivanen)
CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl. (1987)

HAMILTON, H.J.

Lillie's development of the chick.
An Introduction to Embryology.
Henry Holt, New York (1952)

HANAN, E.B.

Absorption of vital dyes by fetal membranes of the chick.
Am. J. Anat. 38, 423-450 (1927)

HELLER, H. D.

The immune response of hens to multiple Escherichia coli injections and transfer of immunoglobulins to the egg and hatched chick.
Res. Vet. Sci. 18, 117-120 (1975)

HERLYN, D.M., BOHNER, H.-J., LÖSCH, U.

IgG turnover in dysgammaglobulinemic chickens.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1169-1172 (1977)

HIGGINS, D.A.

Physical and chemical properties of fowl immunoglobulins.
Vet. Bull. 45, 139-154 (1975)

HOFFMANN-FEZER, G., LÖSCH, U.

Distribution of IgM-, IgG- and IgA-positive cells in lymphatic organs of normo- and dysgammaglobulinemic UM-B19 chickens.
Int. Archs. Allergy appl. Immunol. 70, 346-351 (1983)

HOOD, L.E., WEISSMAN, I.L., WOOD, W.B. and WILSON, J.H.

Immunology.
The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc. (1984)

IVANYI, J., HRABA, T. and CERNY, J.

The elimination of heterologous and homologous serum proteins in chickens at various ages.
Folia biol. Prague 10, 275-283 (1964)

JENSENIUS, J.Chr., ANDERSEN, I., HAU, J., CRONE, M. and KOCH, C.

Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG.
J. Immunol. Meth. 46, 63-68 (1981)

JOHNSTONE, A., THORPE, R.

Immunochemistry in practice.
Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987)

JORDANOV, J. and ANASTASSOVA-KRISTEVA, M.

Über die Veränderungen des Kükens im Hinblick auf die Dotterresorption.

Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik 154, 216-238 (1963)

JÜRGENS, L.

Reinigung von IgG und IgG-Antikörpern aus dem Eidotter und Bestimmung der Temperaturreistenz und Säuretenazität dieser Immunproteine.

Dissertation, München (1987)

KAMINSKI, M. and DURIEUX, J.

Etude comparative des serums de paul, de coq, de poisson, d'embryon et de blanc d'oeuf.

Exp. Cell. Res. 10, 590-596 (1956)

KHATTAB, M.S. and CRAIG, J.V.

Ontogeny of allotype synthesis and decay of maternal allotype in young chickens.

Poultry Sci. 49, 973-976 (1970)

KINCADE, P.W. and COOPER, M.D.

Development and distribution of immunoglobulin containing cells in the chicken.

J. Immunol. 106, 371-382 (1971)

KLEMPERER, F.

Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisierungstherapie.

Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. 31, 356-382 (1893)

KOWALCZYK, K., DAISS, J., HALPERN, J. and ROTH, T.F.

Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken.

Immunology 54, 755-762 (1985)

KRAMER, T.T. and CHO, H.C.

Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hen's egg.

Immunology, 19, 157-167 (1970)

LAEMMLI, U.K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227, 680-685 (1970)

LAURELL, C.B.

Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies.

Anal. Biochem. 15, 45-52 (1966)

LEBACQ-VERHEYDEN, A.-M., VAERMAN, J.-P. and HEREMANS, J.F.

A possible homologue of mammalian IgA in chicken serum and secretions.

Immunology 22, 165-175 (1972)

LEBACQ-VERHEYDEN, A.-M., VAERMAN, J.-P. and HEREMANS, J.F.

Quantification and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions.

Immunology 27, 683-692 (1974)

LEBACQ-VERHEYDEN, A.-M. and RITTER, M.A.

B-cell precursors in early chicken embryos.

Immunology 37, 123-134 (1979)

LERMAN, S.P. and WEIDANZ, W.P.

The effect of cyclophosphamide on the ontogeny of the humoral immune response in chickens.

J. Immunol. 105, 614-619 (1970)

LERNER, K.G., GLICK, B. and McDUFFIE, F.C.

Role of the bursa of Fabricius in IgG and IgM production in the chicken: Evidence for the role of a non-bursal site in the development of humoral immunity.

J. Immunol. 107, 493-503 (1971)

LESLIE, G.A. and CLEM, L.W.

Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III Immunoglobulins of the chicken.

J. exp. Med. 130, 1337-1352 (1969)

LESLIE, G.A. and CLEM, W.L.

Chickens immunoglobulins: biological half lives and normal adult serum concentration of IgM and IgY.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 134, 195-198 (1970)

LESLIE, G.A. and MARTIN, L.N.

Studies on the secretory immunologic system of fowl. III Serum and secretory IgA of the chicken.

J. Immunol. 110, 1-9 (1973a)

LESLIE, G.A. und MARTIN, L.N.

Modulation of immunoglobulin ontogeny in the chicken: Effect of purified antibody specific for μ -chain on IgM, IgY and IgA production.

J. Immunol. 110, 959-967 (1973b)

LESLIE, G.A.

Ontogeny of the chicken humoral immune mechanism.

Am. J. Vet. Res. 36, 482-485 (1975)

LESLIE, G.A., STANKUS, R.P. and MARTIN, L.N.

Secretory immunological system of fowl. V. The gallbladder: an integral part of the secretory immunological system of fowl.

Int. Archs. Allergy appl. Immun. 51, 175-185 (1976)

LIFTER, J., KINCADE, P.W. and CHOI, Y.S.

Subpopulations of chicken B lymphocytes.

J. Immunol. 117, 2220-2225 (1976)

LINNA, T.J., FROMMEL, D. and GOOD, R.A.

Effects of early cyclophosphamide treatment on the development of lymphoid organs and immunological function in the chicken.

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 42, 20-39 (1972)

LOWRY O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J.

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

LÖSCH, U., FRIEDRICH, B., RIEDEL, G.

Immunglobulingehalt keimfreier Kühen während der Konventionalisierung.

Ztr. Versuchstierkunde 12, 58-67 (1970)

LÖSCH, U., KÜHLMANN, I., KLUMPNER, W. and FIEDLER, H.

Course of serum-Ig concentrations in B12 chickens of the UM line.

Immunobiol. 158, 416-425 (1981)

LÖSCH, U. und SCHUMACHER, H.J.

Immunglobulin-M im Dottersachinhalt von Hühnerküken.

Abstracta, 3. Tagg. Ges. Immunol., Marburg (1971)

LÖSCH, U.

Zur Charakterisierung einer erblichen Dysgammaglobulinämie.

Habil. Schrift, Universität München (1972)

LYDYARD, P.M., GROSSI, C.E. and COOPER, M.D.

Ontogeny of B-cells in the chicken.

J. exp. Med. 144, 79-97 (1976)

MANN, H.B. and WHITNEY, D.R.

On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other.

Ann. Math. Statist. 18, 50-60 (1947)

MARINKOVICH, V.A. and BALUDA, M.A.

In vitro synthesis of δ -M like globulin by various chick embryonic cells.

Immunology 10, 383-397 (1966)

MARTIN, L.N. and LESLIE, G.A.

Ontogeny of IgA in normal and neonatally bursectomized chickens with corroborative data on IgY and IgM.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 143, 241-243 (1973)

McARTHUR, W.P., CARSWELL, E.A. and THORBECKE, G.J.

Growth of Rous sarcomas in bursectomized chickens.

J. Natl. Cancer Inst. 49, 907-909 (1972)

MEHNER, A. und HARTFIELD, W.

Handbuch der Geflügelphysiologie, Teil I
Verlag Karger, Basel (1983)

MERKENSCHLAGER, M., RIEDEL, G., KIRCHNER, B. und LÖSCH, U.

Die Immunglobuline bursektomierter Küken in der Immunelektrophorese.
Naturwissenschaften 53, 408-409 (1966)

MERKENSCHLAGER, M., LÖSCH, U., KIRCHNER, B., RIEDEL, G., GRUBER, F.

Immunglobulingehalte in Serum junger gnotobiotischer Mastküken.
Z. Tierphysiol. Tierern. u. Futtermittelkde. 22, 337-349 (1967)

ORLANS, E. and ROSE, M.E.

An IgA-like immunoglobulin in the fowl.
Immunochem. 9, 833-838 (1972)

OUCHTERLONY, O.

Diffusion in gel methods for immunological analysis. II.
Progr. in Allergy 6, 30-154 (1962)

PATTERSON, R., YOUNGNER, J.S., WEIGLE, W.O., DIXON, F.J.

Antibody production and transfer to egg yolk in chicken.
J. Immunol. 89, 272-278 (1962a)

PATTERSON, R., YOUNGNER, J.S., WEIGLE, W.O. and DIXON, F.J.

The metabolism of serumproteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary of the hen.
J. gen. Physiol. 45, 501-513 (1962b)

PEPPARD, J.V., HOBBS, S.M., JACKSON, L.E., ROSE, M.E. and MOCKETT, A.P.A.

Biochemical characterization of chicken secretory component.
Eur. J. Immunol. 16, 225-229 (1986)

RAMMENSEE, M.

Immunglobulinkonzentration in Serum, Sekret, Ei und Embryo des Haushuhns.
Dissertation, München (1984)

RATCLIFFE, M.J.H., LASSILA, O., PINK, J.R.L. and VAINIO, O.

Avian B cell precursors: surface immunoglobulin expression is an early, possibly bursa-independent event.

Eur. J. Immunol. 16, 129-133 (1986)

READ, P.C., JENKIN, C.R. and TURNER, K.J.

The synthesis by foetal chicks and rats of serum proteins having some properties of the immunoglobulins.

Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 43, 699-712 (1965)

ROITT, I.M., BROSTOFF, J., MALE, D.K.

Immunology.

Grower Medical Publishing Ltd., London (1985)

ROMANOFF, A.L. und ROMANOFF, A.G.

The avian egg.

Macmillan, New York (1948)

ROMANOFF, A.L.

The avian embryo. Structural and functional development.

Macmillan, New York (1960)

ROSE, M.E., ORLANS, E. and BUTTRESS, N.

Immunglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white.

Eur. J. Immunol. 4, 521-523 (1974)

ROSE, M.E. and ORLANS, E.

Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick.

Dev. Comp. Immunol. 5, 15-20 (1981)

SACHS, L.

Angewandte Statistik.

Springer-Verlag, Berlin (1984)

SAITO, Z. and MARTIN, W.G.

Ovalbumin and other water-soluble proteins in avian yolk during embryogenesis.

Can. J. Biochem 44, 293-301 (1966)

SALOMON, J.B.

Foetal and neonatal immunology.

In: Frontiers of Biology

North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London (1971)

SALOMON, J.B.

The appearance and nature of opsonins for goat erythrocytes during the development of the chicken.

Immunology 11, 79-87 (1966a)

SALOMON, J.B.

Induction of antibody formation to goat erythrocytes in the developing chicken embryo and effects of maternal antibody.

Immunology 11, 89-96 (1966b)

SCHRANNER, I. und LÖSCH, U.

Immunological identification of avian monomeric and polymeric immunoglobulin M and immunoglobulin A after fractionation on sodium dodecylsulfate pore gradient polyacrylamide gels.

Poultry Sci. 65, 360-368 (1986)

SETO, F. and HENDERSON, W.G.

Natural and immune hemagglutinin forming capacity of immature chickens.

J. exp. Zool. 169, 501-512 (1968)

STEWART, N.W.

Antibodies: their structure and function.

Chapman and Hall Ltd., London (1984)

TALIAFERRO, W.H. and TALMAGE, D.W.

Antibodies in the rabbit with different rates of metabolic decay.

J.Infect. Dis. 99, 21-33 (1956)

TEMPLIS, C.H.

Ontogeny and regulation of the immune response in chicken.

In: Progress in veterinary microbiology and immunology.

Karger, Basel (1988)

- THORBECKE, G.J., WARNER, N.L., HOCHWALD, G.M. and OHANIAN, S.H.
Immune globulin production by the bursa of Fabricius of young chickens.
Immunology 15, 123-133 (1968)
- TIZARD, J.
Veterinary immunology. An introduction.
W.B. Saunders Company, Philadelphia (1987)
- TOIVANEN, A. and TOIVANEN, P.
Avian Immunology: Basic and practice.
CRC Press, Inc., Boca Raton, Fl. (1987)
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. and GORDON, J.
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 (1979)
- VAN METER, R., GOOD, R.A. and COOPER, M.D.
Ontogeny of circulating immunoglobulins in normal, bursectomized and irradiated chickens.
J. Immunol. 102, 370-374 (1969)
- VRBITCH, S.
Sur l'absorption du liquide amniotique par l'embryon
Compt. rend. Soc. Biol. 91, 604-606 (1924)
- WARNER, N.L., UHR, J.W., THORBECKE, G.J., OVARY, Z.
Immunoglobulins, antibodies and the bursa of Fabricius: induction of agammaglobulinemia and the loss of all antibody-forming capacity by hormonal bursectomy.
J. Immunol. 103, 1317-1330 (1969)
- WEEK, B., KROLL, I. and AXELSEN, N.H.
A manual of quantitative immunoelectrophoresis.
Universitetsforlaget, Oslo (1973)
Also published as supplement no. 1/1973 to the Scandinavian Journal of Immunology

WEIDANZ, W.P., KONIETZKO, D. and LERMAN, S.P.

The effect of combined chemical bursectomy on antibody formation at the cellular level.

J. Reticuloendothel. Soc. 9, 635-641 (1971)

WILLIAMS, A.F.

The immunoglobulin superfamily takes shape.

Nature 308, 12-13 (1984)

WILLOUGHBY, E.W., LAMBERT, A.

A sensitive silver stain for proteins in agarose gels.

Anal. Biochem. 130, 353-358 (1983)

YAMAMOTO, H., WATANABE, H., SATO, G. and MIKAMI, T.

Identifikation of immunoglobulins in chicken eggs and their antibody activity.

Jap. J. vet. Res. 23, 131-140 (1975)

ZIEGELMAIER, R.

Über die Resorption der Immunglobuline beim Eintagsküken.

Dissertation, München (1969)

Herrn Prof. Dr. U. Lösch danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, seine jederzeit gewährte, großzügige Unterstützung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. I. Schraner, die durch ihre stets gewährte Hilfe, ihre Anregungen und ihre Kritik wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Prof. Dr. M. Merckenschlager und Herrn Prof. Dr. H. Zucker.

Herrn Prof. Dr. J. Kösters danke ich für die pathologischen Untersuchungen an seinem Institut.

Frau Prof. Dr. H. Gerlach möchte ich meinen besonderen Dank für ihre große Hilfsbereitschaft, ihre Anregungen und ihre stets gewährte Unterstützung aussprechen.

Ausdrücklich danken möchte ich auch Herrn T. Hoschka und Herrn F. Meckendorfer für die hervorragende Pflege der Tiere und Frau J. Cihakova für ihre unermüdliche Unterstützung im Labor.

Allen Mitarbeitern des Labors Lösch danke ich für ihre freundliche Mithilfe.

Lebenslauf

- 27.07.1958 Geboren in Leverkusen, als Sohn von Dr. Helmut Kaspers (Diplomlandwirt) und Christel Kaspers, geborene Schaefer (biologisch-technische Assistentin)
- 1965-1968 Besuch der Grundschule Morsbroich in Leverkusen
- 1968-1971 Besuch des Freiherr-von-Stein Gymnasiums in Leverkusen
- 1971-1977 Besuch der Landrat-Lucas-Schule in Leverkusen-Opladen
- 21.06.1977 Allgemeine Hochschulreife
- 1977-1979 Wehrdienst als Soldat auf Zeit
- 1979-1980 Beschäftigung als Werksstudent bei der Bayer AG in Wuppertal
- 1980-1986 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 06.03.1986 Staatsexamen
- 04.06.1986 Approbation als Tierarzt
- 06/1986 Anfertigung der Dissertation
- 10/86-06/87 Anstellung als teilbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
- 10/87-12/87
- seit 01/1988 wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

